



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLLA E NANOPARTÍCULAS  
BLENDAS PLLA/PMMA E PLLA/PS PARA INCORPORAÇÃO DE UM  
ANÁLOGO DA ISONIAZIDA**

**LUANA BECKER PERES**

**FLORIANÓPOLIS  
2012**



**Luana Becker Peres**

**OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLLA E NANOPARTÍCULAS  
BLENDAS PLLA/PMMA E PLLA/PS PARA INCORPORAÇÃO DE UM  
ANÁLOGO DA ISONIAZIDA**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia Química da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do título de Mestre em  
Engenharia Química.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Sayer  
Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique  
Hermes de Araújo  
Co-orientador: Prof. Dr. Odinei Hess  
Gonçalves

Florianópolis  
2012



**OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLLA E NANOPARTÍCULAS  
BLENDAS PLLA/PMMA E PLLA/PS PARA INCORPORAÇÃO DE UM  
ANÁLOGO DA ISONIAZIDA**

Por

**Luana Becker Peres**

Dissertação submetida como requisito exigido para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração em Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Sayer  
Orientadora

---

Prof. Dr. Pedro H. H. de Araújo  
Co-orientador

---

Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves  
Co-orientador

---

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto  
Coordenador do CPGENQ

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Regina de F. P. M. Moreira  
EQA/UFSC

---

Prof. Dr. Alfredo Tiburcio Nunes Pires  
QMC/UFSC

---

Dr.<sup>a</sup>. Tatiany Jovita de Faria  
MIP /UFSC

Florianópolis, 13 de Março de 2012.



*Para Rafael.  
Toi, mon amour, mon ami.*





## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Pedro e Rute, e à Cacai, por toda dedicação e amor incondicional. À Vó Cema, pelo amor e teimosia. Ao meu irmão, Leonardo, por todas as brigas de infância, paciência e carinho, e à minha irmã, Laize, por todos os chicletes e pelo ótimo trabalho desenvolvido como aluna de Iniciação Científica, que tanto me ajudou.

Ao meu noivo, Rafael Seemann, pelo amor, imenso incentivo, e paciência despendidos todos os dias.

Aos meus orientadores, Claudia Sayer e Pedro Henrique Hermes de Araújo, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, dedicação, amizade e conhecimento. Ao meu co-orientador Odinei Hess Gonçalves, pelos primeiros passos, que mesmo a distância sempre me auxiliou e tornou possível a realização deste trabalho com PLLA. Também à Prof.<sup>a</sup> Regina de Fátima Peralta Muniz Moreira, pela indicação.

Ao Eduardo de Almeida Isoppo, do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), pelas análises de MET. Também ao Prof. Bruno Augusto Mattar Carciofi e Jaqueline Oliveira Moraes, do Laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos (PROFI), pelas análises de DSC. À Doutora Tatiany Faria, do Laboratório de Imunofarmacologia e Doenças Infecciosas (LIDI), pela amizade e auxílio com as análises de HPLC.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Processos (LCP), pela amizade e apoio em todos os dias de trabalho, em especial aos integrantes do grupo de miniemulsão.

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, em especial ao LCP, por todos os recursos disponibilizados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.



*“A resposta certa, não importa nada: o  
essencial é que as perguntas estejam certas.”*

Mário Quintana



## RESUMO

Nanopartículas poliméricas apresentam grande potencial de aplicação como carreadores de fármacos. Suas características típicas de liberação lenta e sustentada, além da viabilidade de aplicação através de variadas rotas de administração, favorecem o aumento da biodisponibilidade do fármaco e a redução dos efeitos colaterais. Polímeros biocompatíveis e biodegradáveis apresentam características importantes para aplicação biomédica como sistemas nanoparticulados. No entanto, algumas propriedades dos biopolímeros como o alto grau de cristalinidade dificultam seu processamento. Nanopartículas blendas de biopolímeros e polímeros sintéticos derivados do petróleo constituem uma alternativa para a obtenção de novos produtos, que apresentam propriedades complementares interessantes para uso em sistemas de liberação sustentada de fármacos. Neste contexto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de nanopartículas de PLLA (poli(L-ácido láctico) e nanopartículas blenda de PLLA/PMMA (poli(metacrilato de metila)) e PLLA/PS (poliestireno) através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente, polimerização em miniemulsão e polimerização em emulsão semeada para incorporação de um fármaco hidrofóbico análogo da isoniazida. Os resultados obtidos mostram que a estabilidade das miniemulsões de PLLA e o diâmetro médio das nanopartículas são diretamente influenciados pela concentração de polímero, bem como pelo tipo de surfactante e solvente orgânico. As imagens de microscopia (MET) aliadas às temperaturas de transição vítrea (determinadas por DSC) apontam para a formação de blendas de PLLA/PMMA miscíveis através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente e imiscíveis por polimerização em miniemulsão. A morfologia encontrada para as nanopartículas de PLLA/PS indica a formação de uma blenda imiscível com estruturas do tipo casca-núcleo. Foi possível incorporar até 5% de fármaco (m/m, em relação à massa de PLLA) às nanopartículas sem que ocorresse a perda de estabilidade das miniemulsões e com eficiência de encapsulação superior a 85%. As nanopartículas blenda de PLLA/PMMA, em especial aquelas com maior concentração de PMMA, apresentaram maior eficiência de encapsulação (aproximadamente 90%).

**Palavras-chave:** Nanopartículas poliméricas, PLLA, Blendas poliméricas, Encapsulação de fármacos.



## ABSTRACT

Polymeric nanoparticles have considerable potential for drug delivery system purposes. Their typical slow and sustained release, as well as feasibility of variable routes of administration, enables improvement of drug bioavailability and reduction of side effects. Biocompatible and biodegradable polymers have interesting characteristics for biomedical application as nanoparticulated systems. On the other hand, some properties of the biopolymers such as high crystallinity encumber their processing. Bio/synthetic (petroleum-derived) polymers nanoparticle blend represents an alternative to the development of new materials with improved properties for the drug delivery systems use. This work discusses the development of PLLA (poly(L-lactic acid)) nanoparticles and PLLA/PMMA (poly(methyl methacrylate)) and PLLA/PS (polystyrene) nanoparticle blends by miniemulsification/solvent evaporation, miniemulsion and seeded emulsion polymerization methods for hydrophobic drug-loaded nanoparticle application. The results show that PLLA miniemulsions stability and nanoparticle size suffer direct influence by the polymer concentration, surfactant type and polymer solvent. Regarding the nanoparticles blend, the preparation method and PMMA presence induced the PLLA crystallinity loss. The microscopic images (TEM) and glass transition temperatures (specified by DSC) indicate the formation of miscible PLLA/PMMA blends obtained by miniemulsification/solvent evaporation technique; and immiscible by miniemulsion polymerization. The PLLA/PS nanoparticles morphology indicates towards the formation of an immiscible blend with core-shell structures. Stable drug loaded nanoparticles and encapsulation efficiency of 85% were obtained with up to 5% of drug (wt/wt, relative to the PLLA mass). The nanoparticle PLLA/PMMA blends, particularly those with larger PMMA concentration, exhibited better encapsulation efficiency (approximately 90%).

**Keywords:** Polymeric nanoparticles, PLLA, Polymer blends, Drug entrapment.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. (Fonte: SCHAFFAZICK et al., 2003).....	36
<b>Figura 2.2:</b> Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: administração convencional vs. sustentada. (Fonte: adaptado de Das e Das, 2003).....	37
<b>Figura 2.3:</b> Representação do método de emulsificação-miniemulsificação/ evaporação do solvente. (Fonte: adaptado de Musyanovych <i>et al.</i> , 2008).....	39
<b>Figura 2.4:</b> Representação da técnica de nanoprecipitação.....	41
<b>Figura 2.5:</b> Esquema ilustrativo da técnica de Emulsificação-Difusão do Solvente. (Fonte: Adaptado de Kwon <i>et al.</i> , 2001) .....	43
<b>Figura 2.6:</b> Representação ilustrativa dos Intervalos de uma reação de polimerização em emulsão em batelada. (Fonte: La Cal, <i>et al.</i> , 2005.).....	44
<b>Figura 2.7:</b> Esquema representativo da Polimerização em Miniemulsão (Fonte: Adaptado de Landfester, 2006.).....	46
<b>Figura 2.8:</b> Estrutura Química de Alguns Poliésteres. (Fonte: adaptado de Park, Ye e Park, 2005).....	51
<b>Figura 2.9:</b> Estrutura Química do PLA .....	52
<b>Figura 2.10:</b> Rotas de síntese de PLA. (Fonte: adaptado de Garlotta, 2001).....	52
<b>Figura 2.11:</b> Estrutura Química da Isoniazida.....	55
<b>Figura 2.12:</b> Rota de síntese do JVA, análogo da isoniazida. (Fonte: FARIA <i>et al.</i> , 2012).....	56
<b>Figura 3.1:</b> Estrutura molecular dos surfactantes utilizados; Lecitina: R1 e R2 são alquilas de cadeia longa; Tween 80: W, X, Y e Z somam 20. ....	58
<b>Figura 3.2:</b> Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas de PLLA utilizando surfactante hidrofílico. ....	60
<b>Figura 3.3:</b> Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas de PLLA utilizando surfactante lipofílico. ....	61
<b>Figura 3.4:</b> Micrografias de MET das nanopartículas de PLLA. ....	68

<b>Figura 3.5:</b> Efeito do tempo e amplitude de sonicação no Dp e PDI das nanopartículas de PLLA (0,3g L-PLLA, 0,072g de lecitina, 10g CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> e 24g de H <sub>2</sub> O foram utilizadas em todos os experimentos).....	69
<b>Figura 3.6:</b> Efeito da concentração de PLLA e razão fase orgânica/fase aquosa (O/W) no Dp e PDI das nanopartículas (L- PLLA, 0,072g de lecitina e 10g CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> foram utilizadas em todos os experimentos).....	72
<b>Figura 3.7:</b> Curvas de DSC do primeiro e segundo aquecimento para o L-PLLA (a, b, respectivamente) e para nanopartículas de L-PLLA, (c, d, respectivamente).....	73
<b>Figura 3.8:</b> Curvas de DSC do primeiro resfriamento para (a) o L-PLLA e (b) para nanopartículas de L-PLLA.....	75
<b>Figura 4.1:</b> Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente.....	80
<b>Figura 4.2:</b> Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA e PLLA/PS via reação de polimerização em miniemulsão. ....	81
<b>Figura 4.3:</b> Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA via reação de polimerização em emulsão semeada. ....	83
<b>Figura 4.4:</b> Curva de calibração do metacrilato de metila (MMA).....	86
<b>Figura 4.5:</b> Curva de calibração do estireno (STY).....	86
<b>Figura 4.6:</b> Micrografias de MET das nanopartículas de (a, b) PLLA e blenda de PLLA/PMMA obtidas via técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente com razões mássicas de (c, d) 5:1 e (f, g) 1:1.....	91
<b>Figura 4.7:</b> Efeito da concentração de PLLA nas cinéticas de polimerização do metacrilato de metila em miniemulsão (conversão gravimétrica).....	93
<b>Figura 4.8:</b> Efeito da concentração de PLLA no diâmetro médio das nanopartículas blenda de PLLA/PPMMA durante as reações de polimerização em miniemulsão.....	93
<b>Figura 4.9:</b> Cinética de polimerização em miniemulsão do metacrilato de metila com conversão acompanhada por gravimetria e cromatografia gasosa (réplica da reação PLLA/MMA-10%).....	94
<b>Figura 4.10:</b> Cinéticas corrigidas de polimerização em miniemulsão do metacrilato de metila (réplica da reação PLLA/MMA-10%).....	95

<b>Figura 4.11:</b> Micrografias de MET das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA com 15% (m/m) de PLLA em relação ao MMA obtidas via polimerização em miniemulsão.....	96
<b>Figura 4.12:</b> Micrografias de MET das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA razão mássica de PLLA/PMMA de 1:2 obtidas via polimerização em emulsão semeada com 4% de KPS como iniciador.....	98
<b>Figura 4.13:</b> Curvas de DSC do segundo aquecimento para o (a) PLLA, (b) PMMA e nanopartículas blenda de PLLA/PMMA obtidas via (c) miniemulsificação/evaporação do solvente (1:5) e (d) polimerização em miniemulsão (1:10).....	99
<b>Figura 4.14:</b> Efeito da concentração de PLLA nas cinéticas de polimerização do estireno em miniemulsão (conversão gravimétrica).....	101
<b>Figura 4.15:</b> Efeito da concentração de PLLA no diâmetro médio das nanopartículas blenda de PLLA/PS nas reações de polimerização em miniemulsão.....	102
<b>Figura 4.16:</b> Cinética de polimerização em miniemulsão do estireno com conversão acompanhada por gravimetria e cromatografia gasosa (réplica da reação PLLA/STY-10%).....	103
<b>Figura 4.17:</b> Cinéticas corrigidas de polimerização em miniemulsão do estireno (réplica da reação PLLA/STY-10%).....	103
<b>Figura 4.18:</b> Micrografias de MET das nanopartículas blenda de PLLA/PS (razão mássica 1:10) tingidas com tetróxido de rutênio obtidas via polimerização em miniemulsão.....	104
<b>Figura 5.1:</b> Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas de PLLA-JVA e blenda de PLLA/PMMA-JVA através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. ....	109
<b>Figura 5.2:</b> Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA-JVA via polimerização em miniemulsão. ....	110
<b>Figura 5.3:</b> Curva de calibração do JVA.....	113
<b>Figura 5.4:</b> Efeito da concentração de JVA na eficiência de encapsulação em nanopartículas de L-PLLA obtidas por miniemulsificação/evaporação do solvente. ....	116
<b>Figura 5.5:</b> Eficiência de encapsulação do JVA em nanopartículas de PLLA e nanopartículas blenda de PLLA/PMMA.....	118
<b>Figura 5.6:</b> Efeito da adição do JVA nas cinéticas de polimerização do MMA via polimerização em miniemulsão (cinéticas corrigidas determinadas por cromatografia gasosa). ....	119

<b>Figura 5.7:</b> Efeito da adição de JVA no diâmetro médio das nanopartículas blenda durante as reações de polimerização em miniemulsão. ....	120
<b>Figura 5.8:</b> Cinética de liberação do JVA a partir de nanopartículas de L-PLLA (5% de JVA em relação à massa de PLLA). ....	120
<b>Figura 5.9:</b> Curvas de DSC do primeiro e segundo aquecimento para o JVA (a, b, respectivamente); Nanopartículas de L-PLLA-JVA (c, d, respectivamente); Nanopartículas blenda de PLLA/PMMA-JVA obtidas via miniemulsificação/evaporação do solvente (1:5) (e, f, respectivamente) e polimerização em miniemulsão (1:10) (g, h, respectivamente). ....	122

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1:</b> Formulações básicas das nanopartículas de PLLA preparadas utilizando surfactante hidrofílico ou lipofílico (métodos 1 e 2). .....	62
<b>Tabela 3.2:</b> Efeito do tipo de surfactante sobre Dp e PDI das gotas polímero-solvente orgânico e nanopartículas de PLLA (0,3g L-PLLA, 10g CHCl <sub>3</sub> e 24g de H <sub>2</sub> O foram utilizadas em todos os experimentos). .....	65
<b>Tabela 3.3:</b> Efeito do tipo de surfactante sobre Dp e PDI das gotas polímero-solvente orgânico e nanopartículas de PLLA (0,3g L-PLLA, 10g CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> e 24g de H <sub>2</sub> O foram utilizadas em todos os experimentos). .....	65
<b>Tabela 3.4:</b> Efeito da concentração de lecitina sobre Dp e PDI das gotas polímero-solvente orgânico e nanopartículas de PLLA (0,3g L-PLLA, 10g CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> e 24g de H <sub>2</sub> O foram utilizadas em todos os experimentos). .....	67
<b>Tabela 3.5:</b> Reprodutibilidade de Dp e PDI das gotas polímero-solvente orgânico e nanopartículas de PLLA (0,3g L-PLLA, 0,072g de lecitina, 10g CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> e 24g de H <sub>2</sub> O foram utilizadas em todos os experimentos). .....	68
<b>Tabela 3.6:</b> Efeito do processo de preparação das nanopartículas sobre o a massa molar do L-PLLA (0,3g L-PLLA (M <sub>w</sub> = 11.500 g/mol), 0,072g de lecitina, 10g CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> e 24g de H <sub>2</sub> O foram utilizadas em todos os experimentos). .....	70
<b>Tabela 3.7:</b> Efeito da massa molar do PLLA sobre Dp e PDI das gotas polímero-solvente orgânico e nanopartículas de PLLA (0,3g PLLA, 0,072g de lecitina, 10g CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> e 24g de H <sub>2</sub> O foram utilizadas em todos os experimentos). .....	71
<b>Tabela 3.8:</b> Temperaturas de transição vítrea (T <sub>g</sub> ), cristalização (T <sub>c</sub> ) e fusão cristalina (T <sub>m</sub> ), Entalpias de cristalização (ΔH <sub>c</sub> ) e fusão cristalina (ΔH <sub>m</sub> ) e grau de cristalinidade (χ <sub>c</sub> ) do PLLA puro e de nanopartículas de PLLA. ....	74
<b>Tabela 4.1:</b> Formulações básicas das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA preparadas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. ....	80
<b>Tabela 4.2:</b> Formulações básicas das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA preparadas via reação de polimerização em miniemulsão. ....	82

<b>Tabela 4.3:</b> Formulações básicas das nanopartículas blenda de PLLA/PS preparadas via reação de polimerização em miniemulsão. ....	82
<b>Tabela 4.4:</b> Formulações básicas das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA preparadas via reação de polimerização em emulsão semeada (0,144g de lecitina, 20g CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> e 48g de H <sub>2</sub> O foram utilizados na preparação das nanopartículas semente). ....	84
<b>Tabela 4.5:</b> Parâmetros do CG utilizados para determinação do teor de monômero no látex. ....	85
<b>Tabela 4.6:</b> Densidade dos constituintes de uma nanopartícula blenda PLLA/PMMA (dados 20°C). ....	88
<b>Tabela 4.7:</b> Efeito proporção mássica dos polímeros no Dp e PDI das gotas polímero-solvente orgânico e nanopartículas blenda de PLLA/PMMA (0,3g de polímero, 0,072g de lecitina, 10g de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> e 24g de H <sub>2</sub> O foram utilizadas em todos os experimentos). ....	90
<b>Tabela 4.8:</b> Efeito concentração mássica de PLLA no Dp e PDI das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA obtidas por polimerização em miniemulsão. ....	92
<b>Tabela 4.9:</b> Efeito concentração mássica de PLLA e iniciador no Dp e PDI das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA obtidas por polimerização em emulsão semeada. ....	97
<b>Tabela 4.10:</b> Efeito concentração mássica de PLLA e iniciador no Np nas sementes de PLLA (Nps) e nanopartículas blenda de PLLA/PMMA (Npb) obtidas por polimerização em emulsão semeada. ....	97
<b>Tabela 4.11:</b> Temperaturas de transição vítrea (Tg), cristalização (Tc) e fusão cristalina (Tm) do PLLA e PMMA puros, e de nanopartículas blenda de PLLA/PMMA obtidas via miniemulsificação/evaporação do solvente (mini/evap) e reação de polimerização (polim/mini). ....	100
<b>Tabela 4.12:</b> Efeito concentração mássica de PLLA no Dp e PDI das nanopartículas blenda de PLLA/PS. ....	101
<b>Tabela 5.1:</b> Formulações básicas das nanopartículas de PLLA-JVA preparadas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente (em todos os experimentos foram utilizado 10g de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> e 24g de H <sub>2</sub> O). ....	111
<b>Tabela 5.2:</b> Formulações básicas das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA-JVA preparadas via miniemulsificação/evaporação do solvente. ....	111

<b>Tabela 5.3:</b> Formulações básicas das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA-JVA preparadas via reação de polimerização em miniemulsão. ....	111
<b>Tabela 5.4:</b> Parâmetros do CLAE utilizados para determinação do JVA. ....	113
<b>Tabela 5.5:</b> Efeito da concentração de JVA no Dp e PDI médios das nanopartículas de L-PLLA. ....	116
<b>Tabela 5.6:</b> Diâmetro médio e PDI das nanopartículas de PLLA e PLLA/PMMA contendo 5% (m/m) de JVA. ....	117
<b>Tabela 5.7:</b> Temperaturas de transição vítrea (T <sub>g</sub> ), cristalização (T <sub>c</sub> ) e fusão cristalina (T <sub>m</sub> ) e Entalpias de cristalização ( $\Delta H_c$ ) e fusão cristalina ( $\Delta H_m$ ) do JVA e de nanopartículas (NP) de PLLA e PLLA/PMMA. ....	123





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	-	Acetonitrila;
AIBN	-	2,2-azo-bis-isobutironitrila;
CG	-	Cromatografia Gasosa;
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
CMC	-	Concentração Micelar Crítica;
CTMA-Cl	-	Cloreto de cetiltrimetilamônio;
DLS	-	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento Dinâmico de Luz);
DMSO	-	Dimetilsulfóxido;
DSC	-	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (Calorimetria exploratória diferencial);
GPC	-	<i>Gel Permeation Chromatography</i> (Cromatografia de permeação em Gel);
H-PLLA	-	PLLA de alta massa molar (67.400 g/mol);
INH	-	Isoniazida;
IP	-	Índice de Polidispersidade ( $M_w/M_n$ )
KPS	-	Persulfato de potássio;
L-PLLA	-	PLLA de baixa massa molar (11.500 ou 13.700 g/mol);
MET	-	Microscopia Eletrônica de Transmissão;
MMA	-	Metacrilato de Metila;
Mini/evap	-	Miniemulsificação/Evaporação do Solvente;
O/W	-	<i>Oil/water</i> (óleo/água);
PCL	-	Poli(caprolactona);
PDI	-	Índice de polidispersão;
PDLA	-	Poli(D-ácido lático);
PDLLA	-	Poli(D-L-ácido lático);
PHBV	-	Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato);
PHBV/PS	-	Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)/poliestireno;
PHBV/P(S-co-MAA)	-	Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)/poli(estireno-co-ácido metacrílico);
PLA	-	Poli(ácido lático);
PLLA	-	Poli(L-ácido lático);
PLLA/PMMA	-	Poli(L-ácido lático)/poli(metacrilato de metila);
PLLA/PS	-	Poli(L-ácido lático)/poliestireno;
PLGA	-	Poli(ácido lático-co-glicólico);
PMMA	-	Poli(metacrilato de metila);

Polim/mini	-	Polimerização em miniemulsão;
PS	-	Poliestireno;
PVA	-	Poli(álcool vinílico);
PVA 80%	-	Poli(álcool vinílico) com grau de hidrólise 80%;
PVA 88%	-	Poli(álcool vinílico) com grau de hidrólise 88%;
PVP 40	-	Poli(vinilpirrolidona);
SDS	-	Docedil sulfato de sódio;
Span 80	-	Sorbitano monooleato;
STY	-	Estireno;
TB	-	Tuberculose;
THF	-	Tetrahidrofurano;
Tween 80	-	Polioxietileno-20-sorbitano monooleato;

## LISTA DE SÍMBOLOS

$D_p$	-	Diâmetro médio das nanopartículas (nm);
$EE$	-	Eficiência de encapsulação (%);
$m_{L0}$	-	Massa total de látex (massa de monômero + sólidos não poliméricos + água alimentados) (g);
$m_{Livre}$	-	Massa de fármaco determinado em 1mL de fase aquosa (fármaco livre, não encapsulado, $\mu\text{g}$ )
$m_m$	-	Massa de monômero (g);
$m_{m0}$	-	Massa de monômero alimentado (g).
$m_{m0}$	-	Massa de monômero no vial, calculada segundo equação da reta (g);
$M_n$	-	Massa molar numérica média (g/mol)
$m_{PLLA}$	-	Massa de PLLA (g);
$m_T$	-	Massa total de látex (g);
$m_{Total}$	-	Massa de fármaco determinado em 1mL de dispersão de nanopartículas (fármaco total, $\mu\text{g}$ )
$m_V$	-	Massa de látex no vial (g);
$M_w$	-	Massa molar ponderal média (g/mol)
$N_p$	-	Número de partículas em cada 1g de látex;
$T_c$	-	Temperatura de cristalização ( $^{\circ}\text{C}$ );
$T_g$	-	Temperatura de transição vítrea ( $^{\circ}\text{C}$ );
$T_m$	-	Temperatura de fusão cristalina ( $^{\circ}\text{C}$ );
$V_p^1$	-	Volume de uma partícula ( $\text{cm}^3$ );
$V_p^T$	-	Volume total de partículas ( $\text{cm}^3$ );
$X$	-	Conversão;
$X_m$	-	Conversão média;
$\Delta H_c$	-	Entalpia de cristalização (J/g);
$\Delta H_m$	-	Entalpia de fusão (J/g);
$\Delta H_m^c$	-	Entalpia de fusão do polímero 100% cristalino;
$\rho_m$	-	Densidade do monômero ( $\text{g}/\text{cm}^3$ );
$\rho_{PLLA}$	-	Densidade do PLLA ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
$\rho_{pol}$	-	Densidade do polímero ( $\text{g}/\text{cm}^3$ );
$\chi_c$	-	Grau de cristalinidade;



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I.....</b>		<b>31</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>1.1</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>1.2</b>	<b>ESTRUTURA DO TRABALHO.....</b>	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>		<b>35</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1</b>	<b>NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS .....</b>	<b>35</b>
2.1.1	TECNOLOGIA DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE FÁRMACOS .....	36
2.1.2	TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS .....	37
2.1.3	INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DO FÁRMACO .....	47
<b>2.2</b>	<b>HÍBRIDOS E BLENDS POLIMÉRICAS – NANOCOMPÓSITOS.....</b>	<b>48</b>
2.2.1	NANOCOMPÓSITOS VIA REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM EMULSÃO SEMEADA.....	49
2.2.2	NANOCOMPÓSITOS VIA REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO .....	49
<b>2.3</b>	<b>POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS .....</b>	<b>50</b>
2.2.1	POLI(ÁCIDO LÁTICO) - PLA.....	51
<b>2.4</b>	<b>NANOPARTÍCULAS NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE .....</b>	<b>54</b>
<b>2.5</b>	<b>ANÁLOGOS DA ISONIAZIDA .....</b>	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>		<b>57</b>
<b>3</b>	<b>NANOPARTÍCULAS DE PLLA.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
3.1.1	MATERIAIS .....	57
3.1.2	PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	59
3.1.3	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	62
<b>3.2</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>64</b>
3.2.1	EFEITO DO TIPO E CONCENTRAÇÃO DE SURFACTANTE E TIPO DE SOLVENTE ORGÂNICO .....	64
3.2.2	EFEITO DO TEMPO E AMPLITUDE DE SONICAÇÃO .....	69
3.2.3	EFEITO DA MASSA MOLAR DO PLLA .....	71
3.2.4	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PLLA E RAZÃO FASE ORGÂNICA/FASE AQUOSA .....	71
3.2.5	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POR DSC.....	73
<b>3.3</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>

<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>77</b>
<b>4        NANOPARTÍCULAS BLENDA DE PLLA/PMMA E PLLA/PS .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1      MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>77</b>
4.1.1    MATERIAIS .....	77
4.1.2    PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	78
4.1.3    CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	84
<b>4.2      RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>89</b>
4.2.1    NANOPARTÍCULAS BLENDA DE PLLA/PMMA .....	89
4.2.2    NANOPARTÍCULAS BLENDA DE PLLA/PS.....	100
<b>4.3      CONCLUSÕES.....</b>	<b>104</b>
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>107</b>
<b>5        ENCAPSULAÇÃO DE JVA EM NANOPARTÍCULAS DE PLLA E BLENDA</b>	
<b>DE PLLA/PMMA .....</b>	<b>107</b>
<b>5.1      MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>107</b>
5.1.1    MATERIAIS .....	107
5.1.2    PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	108
5.1.3    CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	112
<b>5.2      RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>115</b>
5.2.1    EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE JVA SOBRE A EFICIÊNCIA DE	
ENCAPSULAÇÃO .....	115
5.2.2    EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO JVA EM DIFERENTES CONDIÇÕES	
EXPERIMENTAIS .....	117
5.2.3    CINÉTICA DAS POLIMERIZAÇÕES EM MINIEMULSÃO PARA	
ENCAPSULAÇÃO DO JVA.....	119
5.2.4    ESTUDOS PRELIMINARES DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO JVA .....	120
5.2.5    CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POR DSC.....	121
<b>5.3      CONCLUSÕES.....</b>	<b>124</b>
<b>CAPÍTULO VI .....</b>	<b>125</b>
<b>6        CONCLUSÕES.....</b>	<b>125</b>
<b>6.1      SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>127</b>
<b>CAPÍTULO VII.....</b>	<b>129</b>
<b>7        REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>129</b>

# CAPÍTULO I

## 1 INTRODUÇÃO

A liberação de fármacos pode ser descrita como a aplicação dos princípios químicos e biológicos para controlar in vivo a cinética química e a dinâmica de moléculas de fármaco para benefício clínico. De modo geral, quando administradas pelos métodos convencionais de terapêutica farmacológica, apenas uma fração da dose do fármaco é realmente aproveitada, ou porque o medicamento foi removido do sistema antes mesmo de atingir seu alvo, ou porque atingiu o alvo “errado” (UCHEGBU; SCHATZLEIN, 2006). Por essa razão, muitos estudos têm se concentrado na busca por um sistema de liberação sustentada a fim de maximizar a atividade do fármaco e diminuir seus efeitos colaterais.

O rápido avanço nas áreas de bio e nanotecnologia das últimas décadas impulsionou a descoberta de novos fármacos e o desenvolvimento de técnicas avançadas de liberação de fármacos. A produção de nanopartículas poliméricas tem sido alvo da atenção de indústrias farmacêuticas, bem como da comunidade científica, uma vez que apresentam características e propriedades interessantes no uso como sistemas de liberação sustentada de fármacos.

O desenvolvimento de sistemas carreadores de produtos farmacêuticos ainda é um grande desafio. Durante muitos anos foram incorporados fármacos em polímeros inertes ou não erodíveis e um grande inconveniente do uso destes dispositivos era a não biodegradabilidade dos mesmos, requerendo remoção cirúrgica destes após o esgotamento do fármaco (RATHBONE; HADGRAFT; ROBERTS, 2002). Desde o desenvolvimento e utilização de polímeros bioreabsorvíveis para suturas cirúrgicas, novos polímeros biodegradáveis, como o PLA (poli(ácido láctico)), PLGA (poli(ácido láctico-co-glicólico) e PCL (policaprolactona), têm sido sintetizados e amplamente empregados na liberação sustentada de fármacos. Estes polímeros degradam in vivo tanto enzimaticamente quanto por reações de hidrólise, com formação de produtos não tóxicos reabsorvíveis (LI; JASTI, 2005). No entanto, algumas propriedades dos biopolímeros, como o alto grau de cristalinidade, limitam seu processamento. Nanopartículas blendas de biopolímeros e polímeros sintéticos derivados de petróleo constituem uma alternativa para a obtenção de

novos produtos, que apresentam propriedades complementares não encontradas nos polímeros isoladamente, podendo ser moduladas como desejável através do ajuste da proporção dos polímeros na blenda, da organização estrutural dos polímeros e da morfologia da nanopartícula.

Na literatura é possível encontrar diversos métodos de preparação de nanopartículas poliméricas, cada qual com suas vantagens e desvantagens. Estes métodos podem ser divididos em duas categorias principais: aqueles cuja preparação requer uma reação de polimerização do monômero, como por exemplo, reações de polimerização em emulsão, miniemulsão e polimerização interfacial, e aqueles em que são utilizados polímeros pré-formados, tais como emulsificação com evaporação do solvente, nanoprecipitação e *salting-out* (REIS *et al.*, 2006; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Independentemente do método de obtenção de nanopartículas poliméricas adotado, cada técnica exige o estudo de uma formulação de preparo exclusiva, visto que vários parâmetros, como a técnica de preparação selecionada, a natureza do polímero, o tipo de fármaco e as propriedades físico-químicas de outras substâncias utilizadas na formulação, interferem na produção e nas características finais das nanopartículas. A obtenção de nanossistemas com elevada eficiência de encapsulação e distribuição de tamanho de partícula homogênea, adequados à via de administração desejada, continua sendo um desafio para os pesquisadores. Por essa razão, cada sistema deve ser desenvolvido, preparado e caracterizado de modo individual a fim de garantir que as características desejadas de controle de liberação do fármaco possam ser alcançadas (ZAMPIERI, 2009).

O uso de nanopartículas poliméricas como sistemas carreadores de fármacos apresenta um grande potencial no tratamento contra a tuberculose, uma doença que acomete um terço da população mundial e causa aproximadamente 2,0 milhões de mortes por ano (MS, 2009; WHO, 2010(a)). As características típicas de liberação lenta e sustentada das nanopartículas, assim como a viabilidade de aplicação através de variadas rotas de administração, favorecem o aumento da biodisponibilidade do fármaco e a redução da frequência de doses, atenuando os problemas com a adesão do paciente à terapia. Nesse sentido, a utilização de nanopartículas pode tornar-se uma solução para o abandono do paciente à terapia, atualmente um dos maiores obstáculos no tratamento da tuberculose. (GELPERINA *et al.*, 2005).

Tendo em vista os sistemas de liberação prolongada, bem como a urgência na busca por novos fármacos para o tratamento da tuberculose, faz-se necessário uma investigação mais aprofundada da utilização de



sistemas carreadores nanoparticulados no tratamento farmacológico da tuberculose pulmonar. Nesse contexto, este trabalho aborda o encapsulamento do JVA, um análogo hidrofóbico da isoniazida, em nanopartículas poliméricas de poli(L-ácido láctico) e em nanopartículas blenda de poli(L-ácido láctico)/poli(metacrilato de metila), avaliando o efeito das propriedades dos polímeros e das técnicas de preparação das nanopartículas na incorporação e liberação deste fármaco, que, segundo o estudo de De Vecchi (2010), foi mais efetivo na inibição do crescimento micobacteriano em macrófagos infectados quando incorporado à uma matriz polimérica em comparação a sua forma livre (não encapsulada).

## 1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consiste na obtenção de nanopartículas poliméricas de poli(L-ácido láctico) - PLLA e nanopartículas blenda de poli(L-ácido láctico)/poli(metacrilato de metila) - PLA/PMMA e poli(ácido láctico)/poliestireno - PLA/PS, e sua utilização na encapsulação de JVA, um análogo da isoniazida. Para a obtenção das nanopartículas foram utilizadas reações de polimerização em miniemulsão, emulsão semeada e a técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. Para tanto, foi necessário avaliar:

- O efeito da concentração e massa molar do PLLA, da concentração e tipo de surfactante, sobre o diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas de PLLA;
- O efeito do tempo e amplitude de sonicação no diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas de PLLA;
- A influência da razão mássica de PLLA/PMMA na estabilidade das miniemulsões de nanopartículas blenda obtidas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente;
- A influência da razão mássica de PLLA/monômero (metacrilato de metila ou estireno) sobre a cinética da reação e o diâmetro médio das nanopartículas blendas obtidas por polimerização em miniemulsão;
- O efeito da razão de PLLA/metacrilato de metila, da concentração e o tipo de iniciador na cinética da reação, no diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas blenda obtidas por polimerização em emulsão semeada;

- A eficiência de encapsulação e a cinética de liberação do JVA em nanopartículas de PLLA e nanopartículas blenda de PLLA/PMMA.

## 1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

Para facilitar a apresentação e compreensão, este trabalho foi estruturado em sete capítulos, de forma a apresentar em um único capítulo os fundamentos teóricos necessários para o desenvolvimento deste trabalho. Os procedimentos adotados, os resultados, discussões e conclusões foram divididos por assunto, e cada tema é apresentado separadamente em capítulos.

O Capítulo I faz uma breve introdução ao trabalho, enfatizando seus objetivos e ambientando o leitor ao assunto abordado na dissertação. No Capítulo II é apresentada uma revisão bibliográfica sobre as técnicas mais convencionais de preparação de nanopartículas e nanopartículas blenda, sobre o PLLA, o uso de nanopartículas no tratamento da tuberculose e a encapsulação do JVA. No Capítulo III é descrita a síntese das nanopartículas de PLLA através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente e são apresentados os resultados e discussões relativos às nanopartículas, enfatizando a influência das condições de processo na estabilidade das miniemulsões. No Capítulo IV é abordada a síntese e caracterização de nanopartículas blenda de PLLA/PMMA e PLLA/PS obtidas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente e via reações de polimerização em miniemulsão e emulsão semeada. O Capítulo V traz os resultados relativos à encapsulação e liberação do JVA em nanopartículas de PLLA puro e blenda de PLLA/PMMA. As conclusões gerais são apresentadas no Capítulo VI, bem como algumas sugestões para trabalhos futuros que complementem o estudo. E finalmente, no Capítulo VII são apresentadas as referências bibliográficas utilizadas ao longo do trabalho.

## CAPÍTULO II

### 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste Capítulo será apresentada uma breve revisão da literatura disponível acerca dos assuntos pertinentes a este trabalho. Primeiramente, os conceitos de nanopartículas poliméricas e liberação sustentada de fármacos são introduzidos, e são apresentadas informações sobre algumas das técnicas de obtenção de nanopartículas, visando principalmente a encapsulação de fármacos lipofílicos. Em seguida, os processos de obtenção de nanocompósitos (nanopartículas blenda/híbrida) são descritos e na sequência são abordadas informações sobre polímeros biodegradáveis, em especial o PLA. Por fim, são discutidas as informações acerca do uso de nanopartículas no tratamento da tuberculose e da encapsulação e liberação sustentada do JVA.

#### 2.1 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas poliméricas são estruturas de tamanho submicrométrico com uma vasta gama de aplicação nas áreas de biomedicina, eletrônica, química e mecânica. Na área biomédica, as nanopartículas são muito utilizadas como carreadores de fármaco com o objetivo de otimizar a velocidade de cedência e o regime de dosagem do fármaco. O termo nanopartícula refere-se a dois tipos de estruturas, as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem segundo sua composição e organização estrutural (Figura 2.1). Nanocápsulas são sistemas do tipo reservatório ou casca-núcleo, onde o fármaco encontra-se confinado em um núcleo oleoso separado do meio externo por uma fina membrana/parede polimérica, ou encontra-se adsorvido na parede polimérica. As nanoesferas são estruturas maciças onde o fármaco fica retido ou adsorvido na superfície da matriz polimérica. Diferentemente das nanocápsulas, nas nanoesferas não é possível identificar um núcleo diferenciado (AZEVEDO, 2005; REIS *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; RAO; GECKELER, 2011).

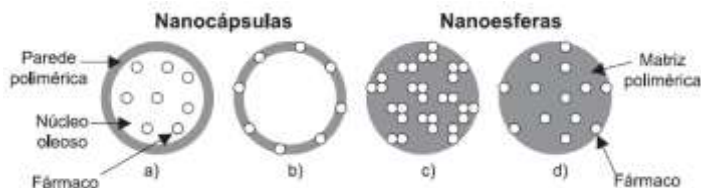


Figura 2.1: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas (modelo fora de escala): a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. (Fonte: SCHAFFAZICK et al., 2003).

### 2.1.1 Tecnologia de liberação sustentada de fármacos

O processo de liberação sustentada de fármacos oferece inúmeras vantagens quando comparada a outros métodos de dosagem convencional (pílulas, injeções, nebulização, “spray”, etc). Entre as vantagens que os nanossistemas podem oferecer destacam-se: diminuição significativa da toxicidade do fármaco e consequente alívio dos efeitos colaterais; maximização da ação farmacológica; proteção contra a degradação prematura do fármaco no organismo; administração mais segura e conveniente, com diminuição do número de doses e manutenção do nível terapêutico no plasma; diminuição de problemas de formulações devido à insolubilidade do fármaco em água, uma vez que tanto fármacos hidrofílicos quanto hidrofóbicos podem ser incorporados, e aumento da adesão do paciente ao tratamento, evitando abandonos do processo terapêutico (AZEVEDO, 2002; FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005; HATEFI; AMSDEN, 2002; ALLEN; CULLIS, 2004).

Cada fármaco possui uma faixa de ação terapêutica que está compreendida entre a concentração mínima de efetividade (CME) e a concentração mínima de toxicidade (CMT), onde abaixo da CME o ativo se torna ineficaz e acima da CMT, tóxico (LI; JASTI, 2005). O objetivo de um sistema de liberação sustentada é manter a concentração do fármaco entre esses dois níveis (faixa terapêutica) por um tempo prolongado, utilizando-se de um menor número de doses (Figura 2.2).

Azevedo (2005) observou que nos métodos de dosagem convencional, a concentração da substância ativa na corrente sanguínea

sofre oscilações: apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina, necessitando de várias doses para que se mantenha a concentração na faixa terapêutica. Já nos sistemas de liberação sustentada de fármacos, espera-se que uma única dose possa manter a concentração da substância na faixa terapêutica por um período de tempo prolongado, aumentando a eficiência desta e evitando intoxicação e os efeitos colaterais.



**Figura 2.2:** Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: administração convencional vs. sustentada. (Fonte: adaptado de Das e Das, 2003).

### 2.1.2 Técnicas de Preparação de Nanopartículas

Convencionalmente, as nanopartículas poliméricas são preparadas principalmente por dois métodos: dispersão do polímero pré-formado e polimerização do monômero. A maioria dos processos de polimerização em uma fase aquosa conduz a polímeros pouco biodegradáveis ou não biodegradáveis. Além disso, eventuais moléculas residuais (monômero, oligômeros, surfactante, etc.) podem ser tóxicas, exigindo uma purificação meticulosa do material coloidal (REIS *et al.*, 2006). Para evitar esse tipo de limitações, métodos que utilizam polímeros pré-formados ao invés de monômeros também vêm sendo utilizados, ainda que seja necessário o uso de solventes orgânicos, geralmente tóxicos, para a dissolução dos polímeros e sua posterior remoção.

Muitas das características das nanopartículas, tais como o tamanho e a distribuição do tamanho de partícula, que afetam

diretamente a taxa de liberação do fármaco, assim como a eficiência de encapsulação (FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005) são advindas do método de preparação escolhido. Outra propriedade também influenciada pelo processo de síntese é a habilidade de interação entre polímero e substâncias ativas contidas na formulação do medicamento. Por essa razão, segundo Lassalle e Ferreira (2007), é crucial o conhecimento dos parâmetros experimentais (solvente orgânico, temperatura, tipo de estabilizador, tipo e velocidade de agitação, etc.) envolvidos em cada método e o efeito que cada parâmetro pode produzir individualmente e em conjunto nas características finais das partículas.

Uma técnica apropriada de preparação de sistemas poliméricos desenvolvidos para a liberação sustentada de fármacos deve atender a alguns requisitos (PARK; YE; PARK, 2005): (1) a estabilidade química e a atividade biológica do fármaco incorporado devem ser mantidas durante o processo de encapsulação; (2) a eficiência de encapsulação e o rendimento das partículas devem ser altos o suficiente para produção em massa; (3) a faixa de diâmetro deve ser compatível com a via de administração; (4) o perfil de liberação do fármaco deve ser reprodutível, evitando-se o *burst* de liberação inicial; (5) a formulação deve apresentar baixa distribuição de tamanho de partícula e deve ser facilmente ressuspensa em água. A escolha de uma técnica em particular dependerá das características físico-químicas do polímero e do fármaco, do sítio de ação do fármaco e da duração da terapêutica.

#### 2.1.2.1 Emulsificação/Evaporação e Miniemulsificação/Evaporação do Solvente

Como descrito por Freitas, Merkle e Gander (2005), a preparação de nanopartículas a partir da técnica de emulsificação (sistemas do tipo óleo em água) com evaporação do solvente consiste, basicamente, em três etapas principais (Figura 2.3): (i) o polímero e o fármaco são dissolvidos em um solvente orgânico volátil imiscível em água; (ii) a fase orgânica é então emulsificada em uma fase aquosa na presença de um surfactante; (iii) e por último, o solvente orgânico é separado da emulsão através da evaporação com elevação da temperatura sob pressões reduzidas ou agitação, levando à formação das nanopartículas sólidas devido à diminuição da solubilidade do polímero no solvente orgânico e sua consequente precipitação.

Quando a emulsificação da fase orgânica e aquosa se dá na presença de um equipamento de dispersão de alta eficiência como uma

sonda de ultrassom, resultando em partículas submicrométricas, a técnica é denominada Miniemulsificação/Evaporação do Solvente e se diferencia da emulsificação/evaporação do solvente pelo tamanho inicial das gotas precursoras das partículas, que são micrométricas no caso da emulsificação/evaporação. Além disso, na miniemulsificação a quantidade de surfactante utilizada é menor a fim de evitar a formação de micelas e a relação polímero/solvente orgânico é maior, isto é, menos solvente orgânico é requerido para dissolução do polímero, uma vez que o tamanho inicial das gotas possui proporções submicrométricas (LEIMANN, 2011).



**Figura 2.3:** Representação do método de emulsificação-miniemulsificação/evaporação do solvente. (Fonte: adaptado de Musyanovych *et al.*, 2008)

O tamanho das nanopartículas pode ser controlado pelo ajuste da taxa de agitação, tipo e quantidade do agente de dispersão, viscosidade das fases orgânica e aquosa, concentração de polímero no solvente orgânico e temperatura. Contudo, esta técnica aplica-se somente a fármacos lipofílicos e apresenta limitações na ampliação de escala devido à grande quantidade de energia requerida para a homogeneização (TRIERWEILER, 2009). Ainda que diferentes tipos de emulsões possam ser utilizados, este método é interessante do ponto de vista econômico, uma vez que a água é utilizada como não-solvente, simplificando e diminuindo os gastos do processo, além de eliminar a necessidade de reciclo e facilitar a etapa de lavagem - para remoção de eventuais impurezas (REIS *et al.*, 2006).

Empregando a técnica de miniemulsificação/evaporação, Musyanovych *et al.* (2008) prepararam nanopartículas de PLLA (poli(L-lactídeo)) de elevada massa molar ( $M_w = 101.700 \text{ g/mol}$ ) utilizando o

clorofórmio como solvente orgânico e uma fase aquosa contendo surfactante hidrofílico. Quando estudado a influência da massa molar ( $M_w = 101.700 \text{ g/mol}$  e  $M_w = 67.400 \text{ g/mol}$ ), os resultados mostraram que quanto maior a massa molar do polímero, maior o tamanho final das nanopartículas, porém, nesse caso, nenhum efeito significativo na distribuição de tamanho foi observado. O trabalho ainda avaliou o efeito do tipo de surfactante e concluiu-se que surfactantes iônicos de baixa massa molar, carregados negativamente (SDS) ou positivamente (CTMA-Cl) possuem efeito estabilizante muito superior quando comparados aos surfactantes não-iônicos (Lutensol e Pluronic), resultando na formação de partículas com diâmetros médio menores e distribuições mais estreitas.

Uma variação da técnica de emulsificação/evaporação do solvente é a dupla (múltipla) emulsão (água/óleo/água) com evaporação do solvente. Uma das grandes vantagens dessa técnica em relação à emulsificação simples com evaporação do solvente é a encapsulação de fármacos hidrofílicos com elevada eficiência de encapsulação (PARK; YE; PARK, 2005). Nesse método o fármaco é dissolvido em água (fase aquosa contendo um agente estabilizante) e o polímero pré-formado em um solvente orgânico (fase orgânica), e então ambas as fases são misturadas. A emulsão resultante (água em óleo) é então dispersa em uma segunda fase aquosa contendo surfactante e, assim, a dupla-emulsão (água em óleo em água) é formada. Com a subsequente evaporação do solvente as nanocápsulas com núcleo aquoso são formadas.

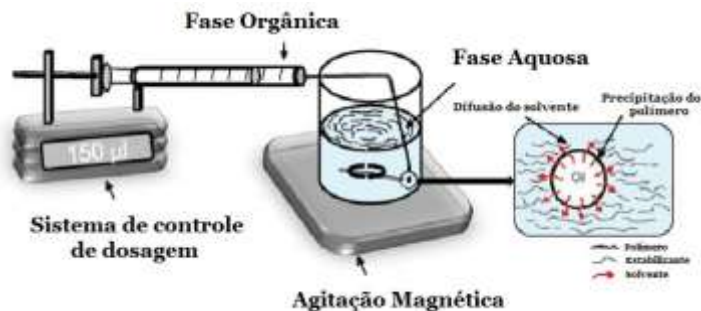
As características das partículas preparadas a partir deste método são dependentes das propriedades do polímero (composição e massa molar), a concentração e a natureza do surfactante, a razão entre o polímero e o fármaco, a temperatura e a velocidade de agitação durante o processo de emulsificação (PARK; YE; PARK, 2005). Da mesma forma como a emulsificação simples, esta técnica apresenta limitações quando da transposição do processo laboratorial para grande escala devido à grande quantidade de energia requerida para a emulsificação.

### 2.1.2.2 Nanoprecipitação

Descrita pela primeira vez por Fessi *et al.* (1989), a técnica de nanoprecipitação (ou deslocamento do solvente) baseia-se na utilização de dois solventes miscíveis, sendo o polímero e o fármaco solúveis em



um deles (fase orgânica) e insolúveis no outro (geralmente água). A nanoprecipitação ocorre por uma rápida dessolvatação do polímero quando a fase orgânica é adicionada, sob agitação, à fase dispersa (não-solvente) contendo ou não surfactante. A precipitação do polímero é resultado de uma rápida difusão do solvente orgânico para o meio disperso (Figura 2.4). O fármaco é imediatamente aprisionado ao polímero durante a precipitação e, finalmente, o solvente orgânico é removido por evaporação. (LASSALLE; FERREIRA, 2007; PAULA, 2009; MORA-HUERTAS; FESS; ELAISSARI, 2010; REIS, 2005; BILATI; ALLÉMANN; DOELKER, 2005).



**Figura 2.4:** Representação da técnica de nanoprecipitação.  
(Fonte: adaptado de Mora-Huertas, Fessi e Elaissari, 2010)

A eficiência do processo, bem como as características finais das nanopartículas, são funções de um conjunto de parâmetros experimentais e físico-químicos, dos quais se destacam a proporção de volume entre fase contínua e dispersa, natureza e concentração de fármaco, de polímero e de emulsificante (quando utilizado), velocidade de agitação, temperatura, pH, tipos de solventes orgânicos e da proporção fármaco/polímero (LEGRAND *et al.*, 2007; ZAMPIERI, 2009).

Este método apresenta a grande vantagem, em relação à miniemulsificação/evaporação do solvente, de não requerer aplicação de elevada energia (sonicação), uma vez que não há necessidade de formação de uma emulsão precursora durante a preparação de nanopartículas. Outras vantagens também podem ser destacadas, tais como: utilização de baixa quantidade de solventes orgânicos tóxicos; e, em alguns casos, obtenção de uma suspensão final de nanopartículas estável mesmo na ausência de surfactantes (BILATI; ALLÉMANN; DOELKER, 2005; CHORNY *et al.*, 2002; TRIERWEILER, 2009). Utilizando a técnica de nanoprecipitação, De Vecchi (2010) encapsulou

JVA em nanopartículas de PLGA, obtendo uma eficiência média de encapsulação de 61% e uma maior efetividade na inibição do crescimento micobacteriano em macrófagos infectados quando comparada ao fármaco livre (não encapsulado).

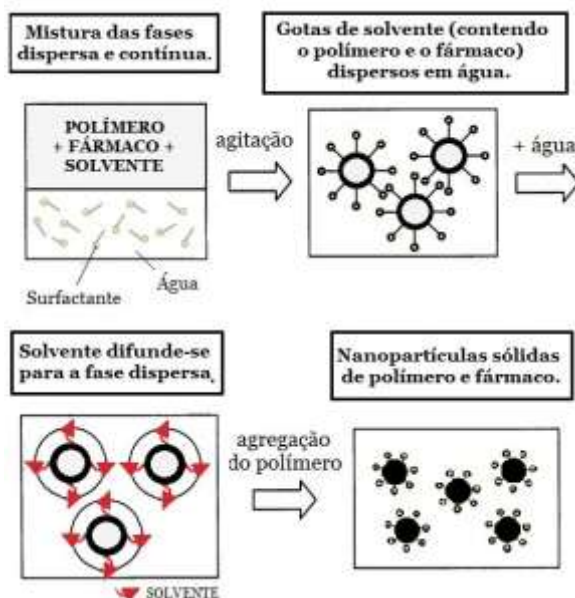
Contudo, em sua forma original, como descrita por Fessi *et al.* (1989), esta técnica se limita à encapsulação de fármacos lipofílicos. Assim, adaptações deste método para encapsulação de fármacos hidrofílicos têm sido sugeridas. Bilati, Alléman e Doelker (2005) descreveram uma metodologia para o encapsulamento de fármacos hidrofílicos em nanopartículas de PLA e PLGA (poli(ácido láctico-co-glicólico). Peltonen *et al.* (2004) mostraram que é possível melhorar a eficiência de encapsulação de fármacos hidrofílicos para até 70% através de pequenas alterações nos parâmetros experimentais (mudanças na quantidade do fármaco modelo, tipo de solvente orgânico, adição de eletrólitos e alteração de pH) sem que seja necessário fazer alterações nas propriedades físicas originais do fármaco.

#### 2.1.2.3 Emulsificação-Difusão do Solvente

A técnica de emulsificação-difusão do solvente consiste na formação de uma emulsão óleo/água entre um solvente orgânico parcialmente solúvel em água e saturado com água (para assegurar o equilíbrio termodinâmico inicial em ambos os líquidos), onde o polímero e o fármaco estão dissolvidos, e uma solução aquosa contendo o surfactante. Ao passo que água vai sendo adicionada a essa emulsão, o solvente orgânico difunde-se para a fase dispersa, resultando na formação das nanoesferas ou nanocápsulas (Figura 2.5), de acordo com a razão óleo/polímero. Por último, dependendo do seu ponto de ebulição, o solvente orgânico pode ser eliminado por evaporação ou filtração (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 2005; ZAMBRANO-ZARAGOZA *et al.*, 2010).

Este método apresenta além de fácil implementação, várias outras vantagens, tais como alta eficiência de encapsulação (geralmente próximo de 70%), não há necessidade de elevada energia para homogeneização, alta reprodutibilidade de batelada-para-batelada, facilidade de ampliação de escala, e estreita distribuição de tamanho de partícula. Entretanto, assim como as outras técnicas já descritas, esta técnica é mais apropriada para encapsulação de fármacos lipofílicos, e tem como desvantagem o grande volume de água necessário e a

solubilidade parcial do solvente orgânico é um limitante do processo (REIS, 2006; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 2005).



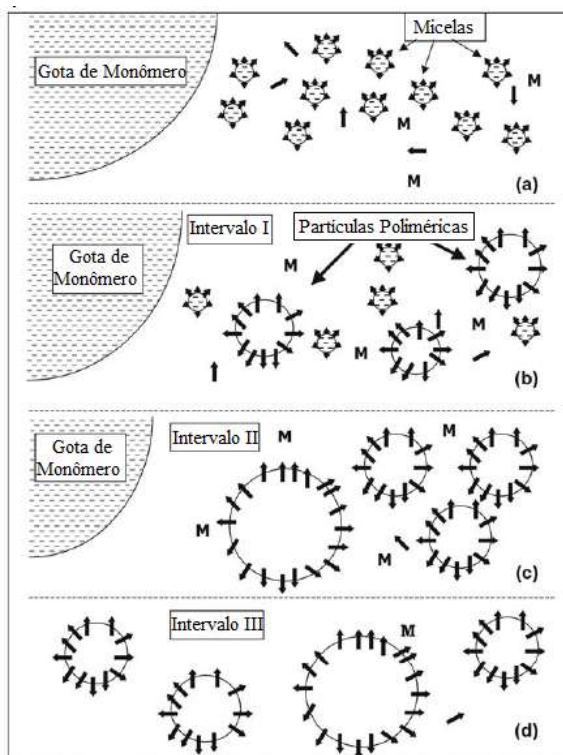
**Figura 2.5:** Esquema ilustrativo da técnica de Emulsificação-Difusão do Solvente. (Fonte: Adaptado de Kwon *et al.*, 2001)

#### 2.1.2.4 Polimerização em Emulsão

Um processo convencional de polimerização em emulsão consiste de um sistema heterogêneo onde um monômero ou uma mistura de monômeros é disperso, através de agitação, em uma fase aquosa na presença de emulsificantes, geralmente em concentrações acima da concentração micelar crítica – CMC. As gotas de monômero formadas, que apresentam diâmetro na faixa de 1 a 10µm, são estabilizadas através da adsorção de surfactante em sua superfície (Figura 2.6). A polimerização é geralmente iniciada por um iniciador de caráter hidrofílico (La CAL *et al.*, 2005, CHERN, 2006).

De modo geral, a reação de polimerização em emulsão em batelada pode ser dividida em três intervalos distintos. O Intervalo I (Figura 2.6-b) é o estágio onde ocorre a nucleação das partículas. Os radicais livres, originados a partir da decomposição do iniciador na fase

aquosa reagem com moléculas de monômero dissolvidas na fase aquosa formando radicais oligoméricos. À medida que estes oligômeros crescem, tornam-se altamente hidrofóbicos e tendem a entrar nas micelas inchadas com monômero, onde a polimerização continua (nucleação heterogênea ou micelar). Por vezes, os radicais oligoméricos continuam a propagação na fase aquosa até alcançar um comprimento crítico e, de tão hidrofóbicas, precipitam, caracterizando a nucleação homogênea. O final do Intervalo I, que tipicamente ocorre ainda com uma baixa conversão de monômero (2-10%), é caracterizado pelo esgotamento das micelas não nucleadas (CHERN, 2006; GUYOT *et al.*, 2007; La Cal *et al.*, 2005).



**Figura 2.6:** Representação ilustrativa dos Intervalos de uma reação de polimerização em emulsão em batelada. (Fonte: La Cal, *et al.*, 2005.)

No Intervalo II (Figura 2.6-c) o sistema é composto apenas por gotas de monômero e partículas poliméricas. O monômero consumido

na polimerização nas partículas poliméricas é rapidamente repostado através do processo de difusão das gotas de monômero até as partículas. Em consequência ao processo de polimerização e transporte de monômero, as gotas de monômero desaparecem ao fim deste intervalo (La Cal, *et al.*, 2005).

Devido ao esgotamento das gotas de monômero, o Intervalo III (Figura 2.6-d) é caracterizado pela diminuição contínua da concentração de monômero nas partículas poliméricas. O produto final é uma dispersão de partículas poliméricas muito pequenas (80-500nm de diâmetro) chamado de látex (La Cal, *et al.*, 2005).

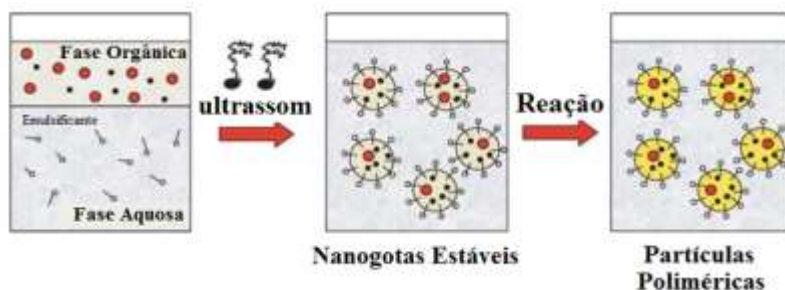
A polimerização em emulsão apresenta a grande vantagem de utilizar água como fase contínua, eliminando a necessidade de utilização de solventes orgânicos, além de proporcionar baixa viscosidade ao meio e facilitar a transferência de calor. A água também age como meio de transferência do monômero das gotas monoméricas para as partículas em formação e meio de troca dinâmica do emulsificante entre as fases. As limitações dessa técnica residem na utilização de monômeros com baixa solubilidade em água e iniciadores hidrofílicos, uma vez que a água também é o *locus* da decomposição do iniciador e formação de oligômeros (EL-AASSER; SUDOL, 1997; RAO; GECKELER, 2011).

#### 2.1.2.5 Polimerização em Miniemulsão

Uma típica reação de polimerização em miniemulsão consiste na formação de uma dispersão estável de monômero em água utilizando-se um equipamento de dispersão de alto cisalhamento (sonicador, por exemplo), um eficiente sistema emulsificante/co-estabilizador, para obtenção de nanopartículas estáveis com diâmetro na faixa de 50-500nm, e iniciador (ASUA, 2002; GUYOT, *et al.*, 2007). A Figura 2.7 apresenta o princípio básico do processo de polimerização via miniemulsão.

O preparo da miniemulsão envolve a dissolução do co-estabilizador e demais componentes (fármaco, polímero pré-formado e/ou outros aditivos) no monômero, formando a fase orgânica, e do surfactante na água, formando a fase aquosa. Em seguida, as duas fases são misturadas através de agitação formando uma pré-emulsão, a qual é submetida à homogeneização de alta eficiência (sonicação, por exemplo), onde ocorre a quebra das gotas grandes de monômero em gotas de tamanho submicrométrico (ASUA, 2002). Com a adição de um

iniciador, a reação prossegue com a polimerização do monômero nessas pequenas gotas (GUYOT, *et al.*, 2007).



**Figura 2.7:** Esquema representativo da Polimerização em Miniemulsão (Fonte: Adaptado de Landfester, 2006.)

A grande diferença entre uma polimerização em miniemulsão e em emulsão é a formação de gotas submicrométricas, a utilização de um co-estabilizador hidrofóbico de baixa massa molar (para evitar a degradação difusional das gotas) e de surfactante livre em concentrações abaixo da CMC, de modo a garantir que a grande parte do surfactante esteja adsorvida na superfície das gotas, evitando a formação de micelas (GUYOT, *et al.*, 2007; RAO; GECKELER, 2011).

Quando o objetivo de preparação das nanopartículas é a encapsulação e liberação sustentada de fármacos ou outros compostos, estes devem ser adicionados à fase orgânica antes da dispersão. A ideia da polimerização em miniemulsão é iniciar a polimerização nas gotas estabilizadas, sem nucleações secundárias e sem requerer o transporte de massa (ANTONIETTI e LANDFESTER, 2002). Essa é a grande vantagem dessa técnica, pois permite que fármacos ou outras substâncias possam ser incorporados às gotas, mantendo suas características desde a dispersão até a obtenção das nanopartículas (LEIMANN, 2011).

Em seu trabalho, Steinmacher (2010) alcançou elevada eficiência de encapsulação de progesterona em nanopartículas de poli(acetato de vinila) via polimerização em miniemulsão, e seus resultados mostram que esta técnica é versátil na preparação de nanopartículas contendo componentes hidrofóbicos em apenas uma etapa. Seus estudos ainda evidenciam que a estabilidade das nanopartículas é fortemente influenciada pelo tipo e concentração de surfactante e co-estabilizador. Nanocápsulas de PMMA preparadas com surfactante e co-estabilizador biocompatíveis foram obtidas por Romio *et al.* (2009). Os autores

avaliaram a concentração de surfactante (lecitina) e observaram que nanopartículas menores foram obtidas quando utilizadas maiores concentrações de lecitina. Em contrapartida, a eficiência de encapsulação do co-estabilizador (Neobee M-5) diminuiu.

### 2.1.3 Incorporação e Liberação do Fármaco

Assim como definido por Soppimath e colaboradores (2001), um sistema de nanopartículas poliméricas bem sucedido é aquele com uma elevada capacidade de aprisionamento de fármaco, de modo a reduzir a quantidade de carreadores requerida para administração. O aprisionamento do fármaco nas nanopartículas pode se dar através de dois métodos: pela incorporação do fármaco durante o processo de produção das nanopartículas ou pela adsorção do fármaco nas nanopartículas já formadas, incubando-as numa solução concentrada que contém o fármaco. Estudos de Alonso *et al.* (1991 *apud* SOPPIMATH *et al.*, 2001) e Ueda, Iwara e Kreuter (1998, *apud* SOPPIMATH *et al.*, 2001) mostraram que, em relação a quantidade de fármaco aprisionado nas nanopartículas, o método de incorporação é mais eficiente.

Além da ordem de adição do fármaco na formulação (incorporação ou adsorção), vários outros fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais se destacam as características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, a natureza do fármaco e do polímero, a quantidade de fármaco adicionada à formulação, a natureza do óleo utilizado (no caso das nanocápsulas), o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica e as condições do método de preparação das nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Uma vez que o fármaco tenha sido administrado no organismo por meio de um sistema de liberação sustentada, o mecanismo de liberação depende de fatores como: a) da razão entre a dessorção e adsorção do fármaco da superfície das partículas; b) da difusão pela matriz polimérica das nanoesferas; c) da difusão através da parede das nanocápsulas; d) do intumescimento da matriz polimérica; e) da erosão/degradação da matriz polimérica; ou f) por uma combinação entre o processo de erosão e difusão (SOPPIMATH *et al.*, 2001; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; PAULA, 2009). O processo de dessorção é responsável pela rápida liberação inicial do agente

farmacêutico devido à fração que está adsorvida ou fracamente ligada a grande área superficial total das nanopartículas. Após este período, a taxa de liberação do fármaco, que se apresenta de forma mais sustentada e lenta, é controlada pelo processo de difusão do fármaco, intumescimento ou erosão do polímero, ou ainda, a combinação destes (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

## 2.2 HÍBRIDOS E BLENDS POLIMÉRICAS – NANOCOMPÓSITOS

Materiais híbridos polímero-polímero e blends poliméricas são preparados pela combinação de dois ou mais tipos de polímero e constituem uma alternativa para a obtenção de novos produtos, que apresentam características únicas e propriedades complementares que não poderiam ser encontradas nos polímeros de forma individual, proporcionando desempenho desejável para o produto final. A produção de blends de biopolímeros com outros polímeros tem como principais objetivos melhorar suas propriedades físicas, seu processamento, controlar sua degradação, além de diminuir seu custo de produção (QUENTAL *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2003).

Normalmente o termo polímero híbrido é aplicado a compostos poliméricos que contêm um material inorgânico covalentemente ligado ao polímero. Outro tipo de classe de polímero híbrido é composto por pelo menos dois tipos de polímeros orgânicos também covalentemente ligados um ao outro (GUYOT *et al.*, 2007). Já o termo blenda polimérica é utilizado para descrever a mistura física de dois ou mais polímeros, sendo que a interação molecular entre as cadeias é predominantemente do tipo intermolecular. Polímeros que apresentam afinidade química originam blends homogêneas, enquanto que polímeros com pouca ou nenhuma afinidade química resultam em blends heterogêneas, que tendem à separação de fases (SCHORK *et al.*, 2005).

Variadas técnicas de polimerização heterogênea, tais como emulsão, miniemulsão, microemulsão, dispersão e suspensão, podem ser empregadas na obtenção de partículas híbridas. As primeiras três técnicas conduzem à formação de partículas de tamanho submicrométrico (10-800nm), enquanto que as duas últimas resultam em micropartículas pequenas (1-30 $\mu$ m) e grandes (50-1500 $\mu$ m), respectivamente (SAYER; ARAUJO, 2010).

Da mesma forma, diversos trabalhos utilizam nanopartículas com misturas físicas de polímeros para encapsulação de fármacos, como



Santander-Ortega *et al.*, (2010), que encapsularam albumina sérica e imunoglobulina em nanopartículas compósito de PLA/PEO por difusão do solvente. Dong e Feng (2006) encapsularam paclitaxel, utilizado no tratamento de câncer, em nanopartículas blendas de PLA/MPEG-PLA por nanoprecipitação. Os autores observaram uma relação direta do tamanho de partícula e da liberação do fármaco *in vitro* com a razão de PLA e MPEG-PLA na blenda polimérica, mostrando que a liberação do fármaco pode ser modulada como desejável através do ajuste da proporção dos polímeros na blenda.

### **2.2.1 Nanocompósitos via Reação de Polimerização em Emulsão Semeada**

A polimerização em emulsão semeada consiste em uma reação de duas etapas. Na primeira etapa é produzido um látex estável, cujas partículas são utilizadas como sementes na segunda etapa da reação. Essas partículas podem ser obtidas via processos convencionais de polimerização do monômero ou a partir da dispersão de polímeros pré-formados. A segunda etapa envolve a polimerização de um segundo monômero, que é adicionado ao látex contendo as sementes. Geralmente, a reação da segunda etapa ocorre em processo semi-contínuo, onde o monômero, o iniciador e o surfactante (quando exigido) são alimentados ao longo da reação e por linhas de alimentação diferentes. Este modo de operação garante um maior controle do tamanho de partícula, da composição e da geração de calor. Entretanto, processos em batelada também podem ser utilizados para preparar partículas compósitos. Nesse caso, todo o monômero e o iniciador são alimentados no início da segunda etapa da reação. Usualmente, antes da adição do iniciador, o monômero é deixado em contato com o látex, sob agitação, por um tempo de uma hora ou mais, para que as partículas sementes possam ser inchadas com o monômero (GUYOT et al, 2007; SUNDBERG; DURANT, 2003).

### **2.2.2 Nanocompósitos via Reação de Polimerização em Miniemulsão**

Devido à minimização do transporte de massa através da fase aquosa na polimerização em miniemulsão, esse sistema é interessante para a produção de polímeros híbridos e blendas através da

polimerização de um monômero na presença de outro polímero. Esta técnica envolve a dissolução de um polímero pré-formado (ou oligômero) em monômero (fase orgânica), que é então disperso e polimerizado segundo uma reação de polimerização em miniemulsão convencional. É comum a obtenção de um sistema monômero-polímero bastante viscoso (em relação a um sistema de monômero), sendo mais difícil a homogeneização e quebra das gotas durante a sonicação. Por outro lado, o polímero previamente formado atua como co-estabilizador, eliminando a necessidade de uso de outro co-estabilizador. Pode ocorrer ainda a formação de enxertos durante a polimerização do monômero ou também separação de fases. De qualquer forma, o produto é uma mistura de um polímero em outro na escala submicrométrica (GUYOT *El al.*, 2007).

Leimann (2011) avaliou a eficiência de encapsulação de progesterona em nanopartículas de PHBV puro e híbridas de PHBV/PS e PHBV/P(S-co-MAA) obtidas via miniemulsificação/evaporação do solvente e polimerização em miniemulsão, respectivamente. O autor observou um aumento na eficiência de encapsulação quando utilizado PHBV de alta massa molar e quando foram preparadas nanopartículas híbridas com poliestireno. Nas nanopartículas de PHBV puro, foi observada maior eficiência quando utilizada a lecitina como surfactante. Todos os casos avaliados mostraram eficiência de encapsulação superior a 80%, indicando a versatilidade de ambas as técnicas utilizadas para encapsulação de progesterona.

## 2.3 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Uma das causas do intenso interesse em uma variedade de polímeros biodegradáveis nas últimas décadas reside em parte na aplicabilidade destes como carreadores para liberação sustentada de agentes farmacêuticos de baixa massa molar e de proteínas bioativas, uma vez que, tantos os polímeros biodegradáveis de origem natural quanto os sintéticos, de baixa e de alta massa molar, são passíveis de clivagem em subprodutos biocompatíveis através de uma reação química ou hidrólise catalisada por enzima (PARK; YE; PARK, 2005).

Um polímero adequado a aplicações em nanossistemas de liberação deve, assim como os produtos de sua degradação, ser inerte, isento de impurezas, biocompatível e biodegradável; não-carcinogênico, não-mutagênico e não alergênico; deve causar pouca ou nenhuma resposta imunológica; e o polímero na forma de nanopartícula deve

possuir capacidade de aprisionamento do fármaco em concentrações suficientes e adequadas à via de administração (URBAN; MUSYANOVYCH; LANDFESTER, 2009). Alguns exemplos de polímeros biodegradáveis utilizados para síntese de sistemas nanoestruturados incluem poliésteres (poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), policaprolactona (PCL)), polianidridos, poli(orto-ésteres), polifosfazenos e polissacarídeos.

Ainda que tenham uma maior biodegradabilidade, os polímeros naturais continuam sendo menos utilizados em função da dificuldade na obtenção de materiais com a mesma pureza e devido a sua imunogenicidade e instabilidade, o que confere aos polímeros sintéticos maior destaque para esta aplicação (PAULA, 2009). Dentre os polímeros sintéticos biodegradáveis, os poliésteres alifáticos, em especial o PLA e seus copolímeros (Figura 2.8), são considerados os mais promissores. A razão pelo grande interesse nos poliésteres é devida à biocompatibilidade e biodegradabilidade destes, sendo os subprodutos da degradação inócuos e de fácil absorção pelo organismo (URBAN; MUSYANOVYCH; LANDFESTER, 2009; PAULA, 2009; HANS; LOWMAN, 2002; SOPPIMATH, 2007; LI; JASTI, 2005; RIEUX et al., 2006).



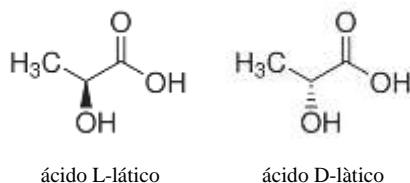
**Figura 2.8:** Estrutura Química de Alguns Poliésteres. (Fonte: adaptado de Park, Ye e Park, 2005)

### 2.2.1 Poli(ácido láctico) - PLA

Poli(ácido láctico) é um poliéster alifático oriundo do ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico), de fórmula molecular  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$  (Figura 2.9). O ácido láctico é um ácido orgânico bifuncional, álcool e ácido carboxílico, e amplamente distribuído na natureza, sendo produzido por animais, plantas e vários microorganismos. Nos humanos e outros mamíferos, o ácido láctico é o subproduto da quebra incompleta da glicose, resultado do processo de fermentação celular (respiração anaeróbica), que ocorre na ausência de oxigênio. O ácido láctico livre na

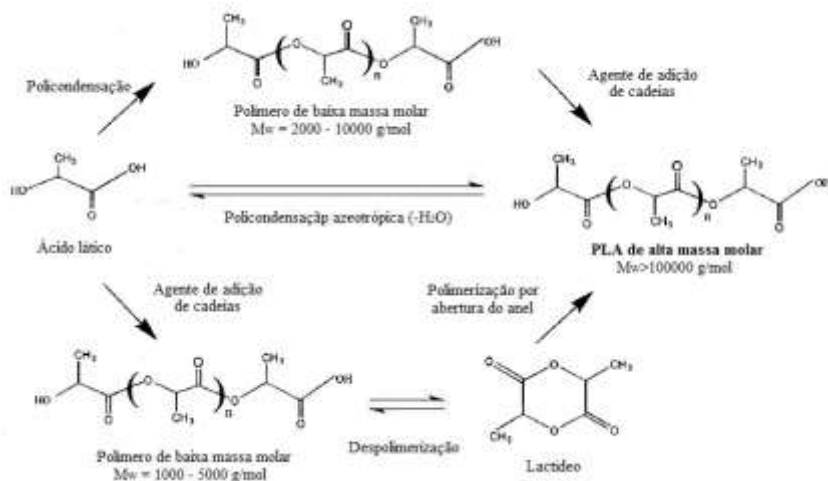
circulação é depois eliminado na forma de água e gás carbônico (SIMÕES, 2007).

O ácido láctico é um dos menores hidroxiácidos com átomo de carbono assimétrico, existindo em duas configurações opticamente ativas, com enantiômeros dextrógiro (ácido D-lático - DLA), e levógiro (ácido L-lático - LLA), sendo a estereofórmula presente nos humanos e outros mamíferos o LLA, e ambos os estereoisômeros encontrados em sistemas bacterianos (GARLOTTA, 2001).



**Figura 2.9:** Estrutura Química do ácido láctico.

Devido ao caráter bifuncional da molécula de ácido láctico, o PLA pode ser sintetizado por mais de uma rota de polimerização: reação de policondensação direta e reação de polimerização por abertura de anel (Figura 2.10).



**Figura 2.10:** Rotas de síntese de PLA. (Fonte: adaptado de Garlotta, 2001)

A existência de ambos os grupos hidroxila e carboxila permite a conversão direta do ácido láctico em poliéster por policondensação. Contudo, apesar de mais simples e de menor custo, essa rota de obtenção gera uma molécula de água, o que resulta na despolimerização das cadeias e obtenção de baixas massas molares. O polímero formado é mais frágil e quebradiço, a menos que um agente de ligação externo (isocianatos, cloretos ácidos, epóxidos, sulfeto de etileno (tiirano)) seja usado para aumentar a sua massa molar. A forma mais comum de obter PLA de elevada massa molar é através da reação de polimerização por abertura do anel do lactídeo, um dímero cíclico do ácido láctico. É possível obter o PLA através da síntese em duas etapas, na qual se obtém primeiro o dímero, lactídeo, e depois, partindo deste, realiza-se a polimerização por abertura do anel (GARLOTTA, 2001; NAMPOOTHIRI; NAIR; JOHN, 2010; SIMÕES, 2007).

O polímero obtido diretamente a partir do monômero de ácido láctico é denominado poli(ácido láctico) e quando o monômero de partida é o dímero lactídeo, o polímero é chamado de poli(lactídeo). Ambos poli(ácido láctico) e poli(lactídeo) apresentam a mesma fórmula estrutural, sendo a diferença de nomenclatura utilizada exclusivamente para diferenciar o processo de síntese e podem ser abreviados pela sigla PLA (JAHNO, 2005).

Da mesma forma como a molécula de ácido láctico apresenta quiralidade, o PLA possui dois estereoisômeros opticamente ativos: poli(L-lactídeo) (PLLA) e o poli(D-lactídeo), e sua mistura racêmica gera o poli(D,L-lactídeo) (PDLLA), opticamente inativo. O PLLA e o PDLA (levógiro e dextrógiro) são imagens especulares um do outro, são opticamente puros e semicristalinos, enquanto o PDLLA é racêmico e amorfo (TSUJI, 2003; LUNT, 1998).

As propriedades mecânicas e o comportamento cristalino do PLA são dependentes da massa molar, da estereoquímica e proporção do monômero de origem (D-lactideo, L-lactideo ou D,L-lactideo), bem como da temperatura de processamento. Dependendo de sua pureza ótica, o PLA pode ser produzido em formas que variam desde totalmente amorfo até polímeros com grau de cristalinidade maior que 40%. A temperatura de transição vítrea do PLA varia de 50 a 80°C, enquanto a temperatura de fusão ( $T_m$ ) pode variar de 130 a 180°C (AURAS *et al.*, 2003).

O PLA apresenta o perfil geral de degradação típico dos poliésteres semicristalinos alifáticos biorreabsorvíveis, sofrendo clivagem das cadeias por cisão hidrolítica das ligações éster. A cisão ocorre de forma aleatória, não enzimática, com o processo de

biorreabsorção ocorrendo em duas fases, hidrólise e metabolização. A taxa de degradação é dependente do tamanho e forma da peça polimérica, bem como da proporção de isômeros, cristalinidade, temperatura e pH de hidrólise (GARLOTTA, 2001; SIMÕES, 2007). A de-esterificação hidrolítica dos poli(lactídeos) origina oligômeros e, finalmente, unidades monoméricas de ácido lático, que serão metabolizados pelo organismo.

## 2.4 NANOPARTÍCULAS NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, que acomete principalmente os pulmões, podendo disseminar-se para outros órgãos ou tecidos. Apesar de ser uma doença curável em mais de 90% dos casos, a TB continua sendo um grande problema de saúde pública. A cada ano, aproximadamente 9,0 milhões de novos casos são reportados e cerca de 2,0 milhões de pessoas morrem em consequência da doença. Todos os continentes são afetados, porém a maior incidência da doença (85% dos casos) está na África (30%) e Ásia (55%) (WHO, 2010(b)). Estima-se que no Brasil mais de 50 milhões de pessoas estejam infectadas com o *M. tuberculosis*, com aproximadamente 80 mil casos novos por ano (MS, 2009).

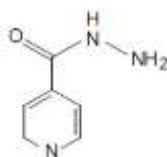
O esquema de tratamento da tuberculose recomendado pelo Ministério da Saúde (Brasil) desde agosto de 2008 é o chamado 2RHZE/4RH de curta duração, composto pela utilização dos fármacos Rifampicina (R), Isoniazida (H), Pirazinamida (Z), e Etambutol (E) na primeira fase do tratamento durante dois meses, seguidos de Rifampicina e Isoniazida durante quatro meses (MS, 2009).

Um dos maiores obstáculos no tratamento da tuberculose é o abandono do paciente à terapia devido ao longo período de tratamento e o grande número de doses. A utilização incorreta e o abandono do tratamento farmacológico favorecem o desenvolvimento de resistência aos fármacos antituberculose (De VECCHI, 2010). Nesse sentido, o uso de nanopartículas poliméricas como sistemas carreadores de fármacos apresenta um grande potencial no tratamento da tuberculose (TB). As características típicas de liberação lenta e sustentada das nanopartículas, bem como seu tamanho nanométrico, favorecem o aumento da biodisponibilidade do fármaco e a redução da frequência de doses, atenuando os problemas com a adesão do paciente à terapia (GELPERINA *et al.*, 2005).

Vários trabalhos relatam o uso de nanopartículas no tratamento de tuberculose. Anisimova *et al.* (2000) avaliaram a liberação de nanopartículas de poli(n-butil cianoacrilato) e poli(iso-butil cianoacrilato) preparadas via polimerização em emulsão contendo três fármacos anti-tuberculose: isoniazida, rifampicina e estreptomicina. Os resultados mostram que houve uma maior acumulação intracelular dos fármacos na forma encapsulada e uma maior atividade anti-microbiana da isoniazida e estreptomicina quando comparada aos fármacos livres (não encapsulados). Resultados semelhantes foram obtidos por De Vecchi (2010). O autor observou que nanopartículas de PLGA contendo IJA preparadas através da técnica de nanoprecipitação foram mais efetivas na inibição do crescimento micobacteriano *in vitro* em macrófagos infectados do que o fármaco na sua forma livre, reforçando o potencial de nanopartículas poliméricas como carreador intracelular de fármacos.

## 2.5 ANÁLOGOS DA ISONIAZIDA

A isoniazida (INH) consiste na hidrazida do ácido isonicotínico (Figura 2.11) e, desde sua descoberta em 1945, é considerada o fármaco de primeira escolha para a quimioterapia da tuberculose. Isso é devido à excelente atividade, ao baixo custo e à relativamente baixa toxicidade deste fármaco. Pertencente à classe farmacológica dos antimicrobianos, a INH é capaz de matar ou inibir o crescimento de bactérias, uma vez que possui uma alta afinidade de ligação aos componentes do metabolismo bacteriano, inibindo a síntese de biomoléculas funcionais ou impedindo a atividade celular normal (De VECCHI, 2010; ANDRADE *et al.*, 2010).

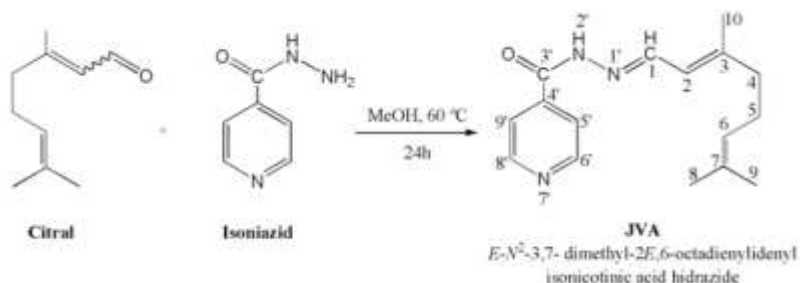


**Figura 2.11:** Estrutura Química da Isoniazida

Diante da resistência micobacteriana aos fármacos utilizados no tratamento da TB, o desenvolvimento de novos e seletivos fármacos anti-TB se faz urgente e necessário (ANDRADE *et al.*, 2008). Concomitantemente, o interesse na redução dos efeitos colaterais e na

manutenção da concentração de fármaco na faixa de ação terapêutica por um tempo prolongado impulsiona a busca por sistemas alternativos de carregamento de ativos farmacêuticos, tais como nanopartículas poliméricas (HIREMATH; SAHA, 2008).

Nesse sentido, fármacos análogos derivados da isoniazida têm sido sintetizados. Buscando o aumento da hidrofobicidade molecular da isoniazida, de modo a diminuir a tendência de difusão do fármaco para a fase aquosa durante o processo de síntese das nanopartículas, Faria *et al.* (2012) sintetizou o JVA. Os autores conjugaram, através da síntese orgânica, um grupamento citral à molécula de isoniazida (hidrofílica), tornando-a mais hidrofóbica (Figura 2.12).



**Figura 2.12:** Rota de síntese do JVA, análogo da isoniazida. (Fonte: FARIA *et al.*, 2012)

Em testes realizados com isoniazida e JVA encapsulados em nanopartículas de PLGA, De Vecchi (2010) mostrou que, enquanto a isoniazida inibiu o crescimento micobacteriano a partir da concentração de 3  $\mu$ M, o JVA foi eficaz, impedindo a proliferação do bacilo, em concentrações mais baixas, a partir de 1  $\mu$ M. Este resultado confirma a possível empregabilidade de novos compostos e de sistemas poliméricos carreadores de fármaco no tratamento contra a tuberculose.



## CAPÍTULO III

### 3 NANOPARTÍCULAS DE PLLA

Neste capítulo é apresentado o estudo acerca do processo de obtenção de nanopartículas poliméricas de PLLA através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. PLLAs de diferentes massas molares médias ( $M_w = 11.500$  g/mol e  $M_w = 67.400$  g/mol) foram utilizadas. Foi avaliada a influência das massas molares do PLLA, da sua concentração na fase dispersa, do tipo e concentração de surfactante e solvente orgânico sobre a estabilidade das miniemulsões. Foram determinadas as melhores condições de sonicação através da avaliação do tempo e amplitude de sonicação. Os resultados dos testes incluem diâmetro médio, obtido via Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering – DLS), massa molar determinada por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), bem como temperaturas de transição vítrea e de fusão cristalina, obtidas via Calorimetria Diferencial de Varreduta (Differential Scanning Calorimetry – DSC).

O PLLA foi escolhido neste trabalho como biopolímero modelo devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Além disso, o PLA é aprovado para aplicação biomédica pela FDA “Food and Drug Administration” (órgão americano que fiscaliza e autoriza o comércio de alimentos e medicamentos, similar à Anvisa). Os surfactantes aplicados também foram escolhidos devido à sua biocompatibilidade, com exceção do SDS, que foi utilizado por apresentar reconhecida eficiência na estabilização de miniemulsões e por ser um dos mais usados na preparação nanopartículas via miniemulsificação/evaporação do solvente.

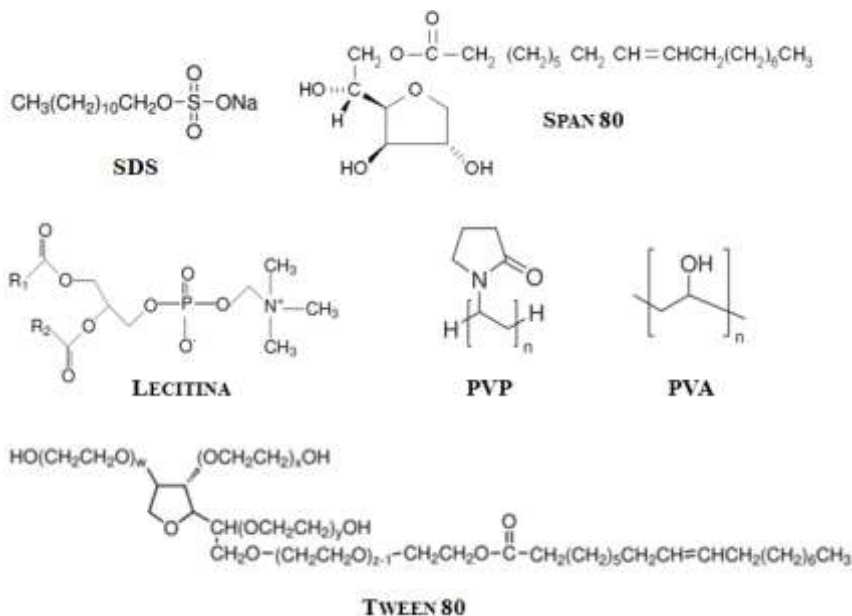
#### 3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

##### 3.1.1 Materiais

Foi utilizado poli(L-lactídeo) de duas massas molares ponderais médias:  $M_w = 11.500$  g/mol (IP = 1,650) (sintetizado e gentilmente cedido pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

(PPGTA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)) e  $M_w = 67.400 \text{ g/mol}$  ( $IP = 1,337$ ) (Sigma-Aldrich), referenciados no texto respectivamente como L-PLLA e H-PLLA. Foram utilizados como surfactante: Lecitina (Alfa Aesar), dodecil sulfato de sódio (SDS, Vetec ultrapuro), polioxietileno-20-sorbitano monooleato (Tween 80, Oxiten), sorbitano monooleato (Span 80, Oxiten), poli(álcool vinílico) (PVA, Polysciences, Inc.) com graus de hidrólise iguais a 80% (FICHA TÉCNICA 22225) e 88% (FICHA TÉCNICA 15132) e massas molares ponderais médias iguais a  $6.000 \text{ g/mol}$  e  $78.000 \text{ g/mol}$ , respectivamente, e polivinilpirrolidona de massa molar igual a  $40.000 \text{ g/mol}$  (PVP-40, Sigma-Aldrich). Diclorometano (Fmaia, P.A.), clorofórmio (Vetec, P.A.) e metanol (Nuclear, P.A.) foram usados para purificação do L-PLLA e preparação das nanopartículas. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos, exceto o L-PLLA.

A Figura 3.1 apresenta a estrutura molecular dos surfactantes utilizados.



**Figura 3.1:** Estrutura molecular dos surfactantes utilizados; Lecitina: R1 e R2 são alquilas de cadeia longa; Tween 80: W, X, Y e Z somam 20.

### 3.1.2 Preparação das Nanopartículas

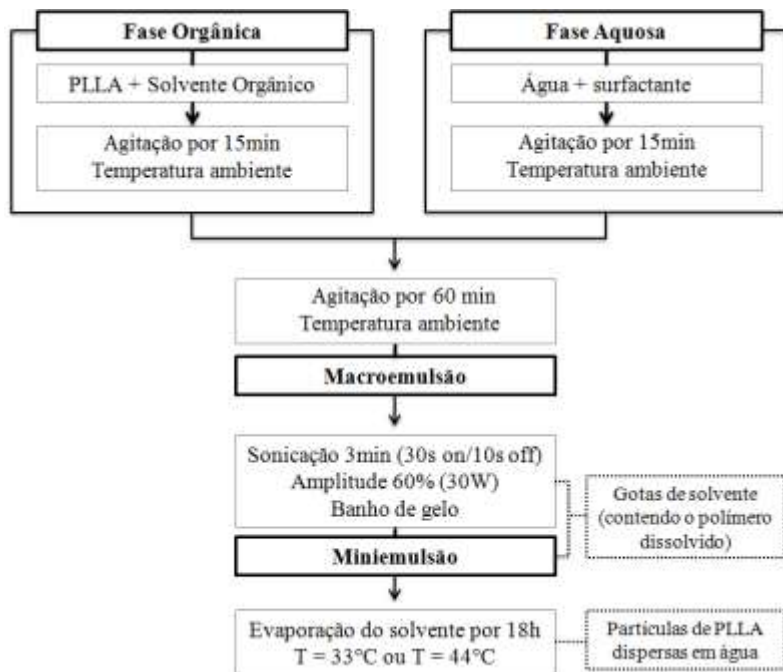
#### 3.1.2.1 Purificação do L-PLLA

O procedimento de purificação do PLLA tem por objetivo a remoção do L-lactídeo residual não convertido em poli(L-lactídeo) durante o processo de polimerização. O L-PLLA (5g) foi dissolvido em clorofórmio (50mL) sob agitação durante 1h a temperatura ambiente e em seguida precipitado em metanol resfriado a 4°C (150mL) sob agitação por mais 30min. A solução foi centrifugada a 10.000 rpm durante 15min e o precipitado foi seco em estufa de convecção forçada a 60°C até que não houvesse variação de massa (aproximadamente 22h).

#### 3.1.2.2 Preparação das Nanopartículas de PLLA

As nanopartículas de PLLA foram preparadas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente de acordo com o procedimento descrito por Musyanovych *et al.* (2008) e Leimann (2011). Foram realizados testes utilizando surfactantes hidrofílicos (SDS, PVA com graus de hidrólise 80% e 88%, Tween 80 e PVP 40) e lipofílicos (Lecitina e Span 80). Para facilitar o entendimento, o método de preparo foi dividido conforme o tipo de surfactante utilizado.

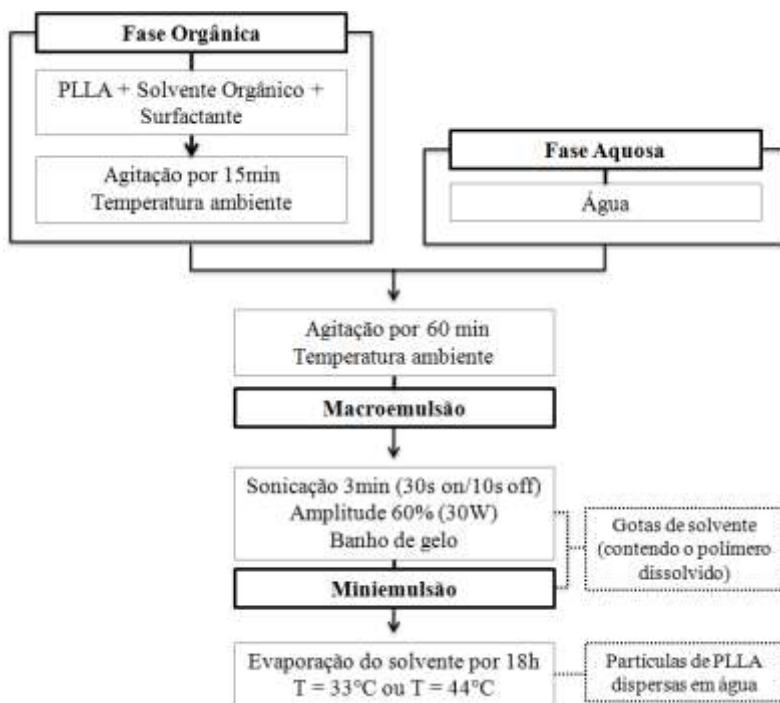
**Método 1 (surfactante hidrofílico):** A fase orgânica foi preparada com a dissolução do PLLA (L-PLLA) em diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ou clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) sob agitação durante 15min. Para preparar a fase aquosa, o surfactante foi dissolvido em água destilada por 15min. A fase aquosa foi então adicionada à fase orgânica e misturada por agitação vigorosa durante 60min. Em seguida, a mistura foi sonicada com ultrassom acoplado a uma ponteira (Fischer Scientific, Ultrasonic Dismembrator Model 500, 400 W com ponta de ½”) por 3min em um regime de pulso de 30s de sonicação e 10s de pausa, com uma amplitude de 60%, resultando na maioria das preparações uma potência de aproximadamente 30 W. Para minimizar o aumento da temperatura durante o processo de dispersão por ultrassom, a miniemulsão foi imersa em banho de gelo. A miniemulsão foi então transferida para um erlenmeyer com capacidade de 250 mL e mantida sob agitação em um Banho Dubinhoff (shaker) a uma temperatura de 33°C por 18h para a evaporação do diclorometano ou 40°C por 18h para a evaporação do clorofórmio. A Figura 3.2 apresenta o fluxograma do processo de preparação das miniemulsões com surfactantes hidrofílicos.



**Figura 3.2:** Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas de PLLA utilizando surfactante hidrofílico.

**Método 2 (surfactante lipofílico):** A fase orgânica foi preparada com a dissolução do PLLA (L-PLLA ou H-PLLA) e do surfactante em diclorometano ou clorofórmio sob agitação durante 15min. Água destilada constituiu a fase aquosa. O procedimento à partir deste ponto foi igual ao do Método 1 descrito anteriormente. A Figura 3.3 apresenta o fluxograma do processo de preparação das miniemulsões com surfactante lipofílico.

Os surfactantes Tween 80 e Span 80 foram utilizados em conjunto e a relação entre os dois foi calculada para resultar em um valor de HLB (Hydrofile-Lypofile Balance) médio igual a 12, sendo que o HLB individual do Span 80 é 4,3 e do Tween 80 é 15 (BERNARDY, 2009). Para tanto, o Tween 80 foi dissolvido em água destilada (fase aquosa) e o Span 80 em clorofórmio ou diclorometano juntamente com o PLLA. Os surfactantes poliméricos PVA com graus de hidrólise 80% e 88%, e PVP-40 foram previamente solubilizados a 80°C por 8h em água destilada, e o teor de sólidos das soluções foram determinados para verificar e ajustar sua concentração na respectiva miniemulsão.



**Figura 3.3:** Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas de PLLA utilizando surfactante lipofílico.

A Tabela 3.1 mostra as formulações básicas adotadas na preparação das nanopartículas de PLLA utilizando ambos os surfactantes hidrofílicos e lipofílicos (métodos 1 e 2).

**Tabela 3.1:** Formulações básicas das nanopartículas de PLLA preparadas utilizando surfactante hidrofílico ou lipofílico (métodos 1 e 2).

Método	PLLA (0,3g)	Solvente Orgânico (10g)	Surfactante <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O
1-C	L-PLLA	CHCl <sub>3</sub>	0,7% SDS	24g
1-D		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		
2-C	L-PLLA ou H-PLLA	CHCl <sub>3</sub>	0,7% Lecitina	24g ou
2-D		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		48g
1,2-C	L-PLLA	CHCl <sub>3</sub>	2,5% Tween 80 + Span 80	24g
1,2-C	L-PLLA	CHCl <sub>3</sub>	7,5% Tween 80 + Span 80	24g
1,2-D		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		
1,2-C	L-PLLA	CHCl <sub>3</sub>	15% Tween 80 + Span 80	24g
1,2-D		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		
1-C	L-PLLA	CHCl <sub>3</sub>	2,5% PVA 80%	24g
1-D		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		
1-C	L-PLLA	CHCl <sub>3</sub>	2,5% PVA 88%	24g
1-D		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		
1-C	L-PLLA	CHCl <sub>3</sub>	2,5% PVP-40	24g

<sup>a</sup>porcentagem mássica em relação à fase orgânica.

### 3.1.3 Caracterização das Nanopartículas

#### 3.1.3.1 Diâmetro Médio (Dp) e Índice de Polidispersão (PDI)

O diâmetro médio (em intensidade) e índice de polidispersão das nanopartículas, que fornece informações acerca da homogeneidade da distribuição dos tamanhos de partícula, foram determinados através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering – DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano S ZEN1600 (ângulo do feixe incidente de 173° e comprimento de onda do laser de 633nm), da Malvern Instruments, alocado no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC. As leituras foram feitas a 20°C a partir de uma alíquota das miniemulsões sem prévia diluição.

#### 3.1.3.2 Massa Molar Média Ponderal (Mw) e Numérica (Mn)

As análises de massa molar média ponderal (Mw) e numérica

(Mn) foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC por Cromatografia de Permeação a Gel (GPC, modelo LC-20A, Shimadzu). O equipamento conta com um detector de índice de refração RID-10A, injetor automático SIL-20A e três colunas de 30 cm de comprimento e 8 mm de diâmetro em série, sendo elas: GPC-801, que detecta polímeros com massa molar de até  $1,5 \times 10^3$  g/mol, GPC-804,  $4,0 \times 10^5$  g/mol e, GPC-807,  $2 \times 10^8$  g/mol. As colunas são recheadas com partículas porosas esféricas de copolímero estireno-divinilbenzeno.

As amostras foram preparadas a partir da diluição de 30mg de polímero seco em 4 mL de tetrahydrofurano (THF, Vetec) e posterior filtração em um filtro de Nylon com  $0,45\mu\text{m}$  de diâmetro de poro. A amostra filtrada foi injetada a temperatura ambiente, com volume igual a  $20\mu\text{L}$ , e analisada a  $35^\circ\text{C}$ . Para tanto, a coluna é aquecida a partir de um forno CTO-20A. A massa molar média foi determinada a partir de uma curva de calibração baseada em padrões de poliestireno com massas molares variando entre 580 g/mol a  $3,8 \times 10^5$  g/mol.

### 3.1.3.3 Temperaturas de Transição Vítrea ( $T_g$ ), Cristalização ( $T_c$ ) e Fusão Cristalina ( $T_m$ )

As temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), cristalização ( $T_c$ ) e fusão cristalina ( $T_m$ ) das amostras foram determinadas utilizando-se um equipamento de Calorimetria Diferencial de Varredura (Differential Scanning Calorimetry – DSC), Perkin-Elmer (Jade DSC), localizado no Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (PROFI) da UFSC. O equipamento foi calibrado com zinco e índio e as análises foram realizadas com aproximadamente 9,0mg de massa de amostra seca ou liofilizada, com taxa de aquecimento e resfriamento de  $20^\circ\text{C}/\text{min}$  sob fluxo de nitrogênio gasoso de  $20\text{mL}/\text{min}$ . A amostra foi aquecida de 0 a  $200^\circ\text{C}$ , e mantida nessa temperatura por 1min, de forma a eliminar a história térmica da mesma. Em seguida, a amostra foi resfriada até  $0^\circ\text{C}$ , mantida nessa temperatura por 1min e novamente aquecida até  $200^\circ\text{C}$ . As curvas obtidas do primeiro e segundo aquecimento foram registradas.

Considerando a entalpia de fusão para o PLA 100% cristalino como  $\Delta H_m^c = 93,7$  J/g (GARLOTTA, 2001), é possível calcular o grau de cristalinidade ( $\chi_c$ ) da amostra, usando a Equação 3.1, em que  $\Delta H_m^c$  é o calor de fusão do PLA totalmente cristalino e  $\Delta H_m$  é a entalpia de fusão para a amostra.

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^c} \times 100\% \quad (\text{Eq. 3.1})$$

#### 3.1.3.4 Morfologia

A caracterização morfológica das partículas poliméricas submicrométricas foi feita através da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em um equipamento da marca JEOL, modelo JEM-1011, com voltagem de aceleração máxima de 100 kV e faixa de magnificação de 50 a 600.000 vezes, alocado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. As amostras para análise foram preparadas sem diluição (teor de sólidos de 1,55%) e gotejadas sobre grades de cobre de 300 mesh/m<sup>2</sup> previamente recobertas com filme de parlódio. As grades foram secas em temperatura ambiente e então, cobertas com filme de carbono e analisadas.

### 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A estabilidade das miniemulsões e o tamanho final das partículas podem ser controlados pelo ajuste da velocidade de agitação, tipo e quantidade de surfactante, viscosidade das fases orgânica e aquosa, massa molar e cristalinidade do polímero e do tipo e concentração de solvente orgânico (Tice; Gilley, 1985).

#### 3.2.1 Efeito do tipo e concentração de surfactante e tipo de solvente orgânico

Para aumentar a estabilidade de miniemulsões, surfactantes são aplicados com o objetivo de minimizar ou retardar a coagulação das partículas. A escolha e a concentração do surfactante desempenha um papel importante na estabilização das gotas e das partículas sólidas obtidas ao final do processo de preparo (Musyanovich *et. al*, 2009). Dessa forma, foram avaliadas as propriedades estabilizantes de diferentes surfactantes na presença de diferentes solventes orgânicos (clorofórmio e diclorometano). O SDS é um surfactante aniônico, enquanto lecitina, Tween 80, Span 80, PVA 80%, PVA 88% e PVP-40 são não-iônicos.



Em todos os experimentos foram utilizados 0,3 g de L-PLLA (Mw = 11.500 g/mol), 10g de solvente orgânico e 24g de água destilada. Os resultados das miniemulsões preparadas utilizando o clorofórmio como solvente orgânico estão apresentados na Tabela 3.2 e com diclorometano na Tabela 3.3.

**Tabela 3.2:** Efeito do tipo de surfactante sobre Dp e PDI das gotas polímero-solvente orgânico e nanopartículas de PLLA (0,3g L-PLLA, 10g CHCl<sub>3</sub> e 24g de H<sub>2</sub>O foram utilizadas em todos os experimentos).

Amostra	Surfactante (g)	Gotas polímero-solvente orgânico		Partículas de PLLA	
		Dp (nm)	PDI	Dp (nm)	PDI
Exp01-C	SDS – 0,072	265	0,366	101	0,138
Exp02-C	Lecitina – 0,072	423	0,403	Não estável	
Exp03-C (2,5%)	Tween 80 – 0,191	1720	0,482	267	0,432
	Span 80 – 0,074				
Exp04-C (7,5%)	Tween 80 – 0,556	1500	0,719	254	0,550
	Span 80 – 0,230				
Exp05-C (15%)	Tween 80 – 1,119	997	0,415	300	0,582
	Span 80 – 0,432				
Exp06-C	PVA 80% – 0,258	1190	0,552	293	0,130
Exp07-C	PVA 88% – 0,258	Sem detecção <sup>a</sup>		604	0,117
Exp08-C	PVP-40 – 0,258	834	0,435	Não estável	

<sup>a</sup>Diâmetro médio das partículas ficou acima do limite de detecção do equipamento (6µm)

**Tabela 3.3:** Efeito do tipo de surfactante sobre Dp e PDI das gotas polímero-solvente orgânico e nanopartículas de PLLA (0,3g L-PLLA, 10g CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e 24g de H<sub>2</sub>O foram utilizadas em todos os experimentos).

Amostra	Surfactante (g)	Gotas polímero-solvente orgânico		Partículas de PLLA	
		Dp (nm)	PDI	Dp (nm)	PDI
Exp09-D	SDS – 0,072	207	0,343	73,5	0,144
Exp10-D	Lecitina – 0,072	392	0,401	178	0,133
Exp11-D (7,5%)	Tween 80 – 0,554	Sem detecção <sup>a</sup>		356	0,471
	Span 80 – 0,218				
Exp12-D (15%)	Tween 80 – 1,108	779	0,555	373	0,306
	Span 80 – 0,429				
Exp13-D	PVA 80% – 0,257	935	0,394	288	0,101
Exp14-D	PVA 88% – 0,260	Sem detecção <sup>a</sup>		596	0,215

<sup>a</sup>Diâmetro médio das partículas ficou acima do limite de detecção do equipamento (6µm).

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3.2 e Tabela 3.3 é possível observar que o diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersão são diretamente afetados pelo tipo de surfactante. Com exceção da lecitina e PVP-40 quando utilizado o clorofórmio como solvente orgânico, todos os surfactantes permitiram a obtenção de miniemulsões estáveis e levaram à formação de partículas submicrométricas. O surfactante aniônico SDS resultou no menor tamanho médio de partículas, independente do solvente orgânico. Apesar de ter sido usado em maior concentração mássica em relação aos outros surfactantes, o par Tween 80 e Span 80 foi o que resultou em distribuições de tamanho (PDI) mais largas. Resultados semelhantes foram obtidos por Musyanovych *et al.* (2008), cujo estudo mostrou que surfactantes iônicos são mais eficientes na estabilização de miniemulsões que os não-iônicos, visto que necessitam de menor quantidade para estabilizar as miniemulsões e resultam em diâmetros médios menores.

De modo geral, as miniemulsões preparadas com diclorometano resultaram em partículas menores e distribuições mais estreitas. Este comportamento mostra que o solvente orgânico utilizado também exerce efeito sobre a estabilidade e o tamanho das nanopartículas. Isto pode estar relacionado com diversas propriedades físico-químicas entre polímero e solvente orgânico, como a solubilidade do polímero no solvente, a viscosidade do polímero e do solvente e, a miscibilidade do solvente em água (JEON *et al.*, 2000). Uma vez que as nanopartículas são formadas a partir das gotas polímero-solvente orgânico após a difusão do solvente orgânico para a fase aquosa e posterior evaporação, o tamanho das nanopartículas é dependente da estabilidade das gotas, que podem colidir e coalescer umas com as outras com maior ou menor facilidade dependendo da eficiência do surfactante (SONG *et al.*, 2006). Os diâmetros médios maiores e distribuições mais largas resultantes das miniemulsões preparadas com clorofórmio podem ser atribuídos a uma maior coalescência entre as gotas polímeros-solvente orgânico devido a uma maior tensão interfacial entre a fase orgânica e aquosa, uma vez que o clorofórmio possui menor solubilidade em água que o diclorometano, 8g/L e 20g/L, respectivamente (FISPQ(a) e (b), 2012). No caso da lecitina e PVP-40 em clorofórmio, os surfactantes não foram completamente capazes de prevenir a agregação das gotas e partículas nas concentrações utilizadas, levando à precipitação do polímero.

Diante dos resultados obtidos quando utilizado a lecitina (nanopartículas estáveis com distribuição de tamanho estreita obtidas utilizando uma baixa concentração mássica de surfactante), optou-se por

dar continuidade nos experimentos utilizando a lecitina como surfactante, devido à sua biocompatibilidade e aprovação pelo “Food and Drug Administration” (FDA), e o diclorometano como solvente orgânico da fase orgânica, visto que é menos tóxico em relação ao clorofórmio.

O efeito da concentração de lecitina sobre a estabilidade da miniemulsão também foi avaliado. Os resultados de Dp e PDI estão apresentados na Tabela 3.4. Em todos os testes foi utilizado 0,3g de L-PLLA, 10g de diclorometano e 24g de água destilada.

**Tabela 3.4:** Efeito da concentração de lecitina sobre Dp e PDI das gotas polímero-solvente orgânico e nanopartículas de PLLA (0,3g L-PLLA, 10g CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e 24g de H<sub>2</sub>O foram utilizadas em todos os experimentos).

Lecitina <sup>a</sup> (g)	Gotas polímero-solvente orgânico		Partículas de PLLA	
	Dp (nm)	PDI	Dp (nm)	PDI
0,35% - 0,038	518	0,416	221	0,214
0,7% - 0,073	392	0,401	178	0,133
1,4% - 0,147	317	0,344	163	0,144

<sup>a</sup> Porcentagem mássica em relação à fase orgânica.

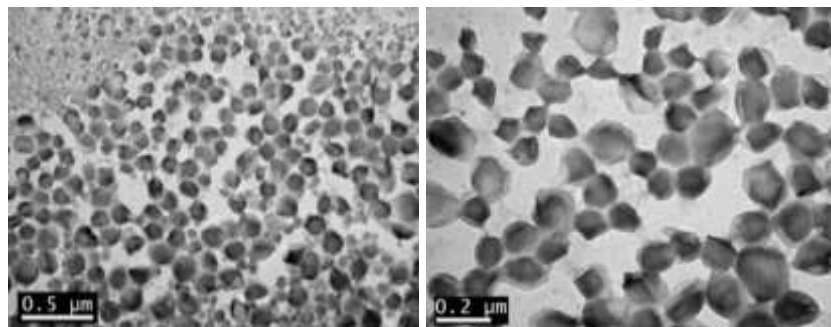
Analisando os resultados referentes à variação da concentração de lecitina nas miniemulsões, observa-se uma diminuição discreta do tamanho de partícula com o aumento da concentração mássica do surfactante e uma distribuição de tamanho mais estreita para uma concentração igual a 0,7% de lecitina (em relação à fase orgânica). Freitas e colaboradores (2005) observaram que a quantidade de surfactante também tem efeito direto sobre as propriedades das nano e micropartículas. Os autores testaram três concentrações de PVA: 1,3%, 3% e 8%, e observaram que a formulação com 3% de PVA foi a que apresentou morfologia esférica e a formação de menos agregados de partícula.

Os diâmetros médios e índices de polidispersão obtidos nos testes de reprodutibilidade da formulação com 0,072g de lecitina, 0,3g de PLLA, 10g de diclorometano e 24g de água destilada estão apresentados na Tabela 3.5 (os experimentos foram realizados em dias diferentes ao longo de um ano).

**Tabela 3.5:** Reprodutibilidade de Dp e PDI das gotas polímero-solvente orgânico e nanopartículas de PLLA (0,3g L-PLLA, 0,072g de lecitina, 10g  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e 24g de  $\text{H}_2\text{O}$  foram utilizadas em todos os experimentos).

Experimento	Gostas polímero-solvente orgânico		Partículas de PLLA	
	Dp (nm)	PDI	Dp(nm)	PDI
PLLA-1	392	0,401	178	0,133
PLLA-2	406	0,333	184	0,134
PLLA-3	381	0,419	176	0,131
PLLA-4	425	0,402	187	0,109
PLLA-5	529	0,445	180	0,140
PLLA-6	450	0,481	172	0,132
PLLA-7	393	0,359	181	0,114
PLLA-8	378	0,337	174	0,108
PLLA-9	381	0,333	181	0,133
PLLA-10	364	0,358	173	0,132
<b>Média</b>	<b>410</b>	<b>0,386</b>	<b>179</b>	<b>0,126</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>49</b>	<b>0,051</b>	<b>5</b>	<b>0,012</b>

A Figura 3.4 apresenta as micrografias (MET) das nanopartículas preparadas pelo Método 2, utilizando a lecitina como surfactante na concentração de 0,7% em relação à fase orgânica e diclorometano como solvente orgânico.



**Figura 3.4:** Micrografias de MET das nanopartículas de PLLA.

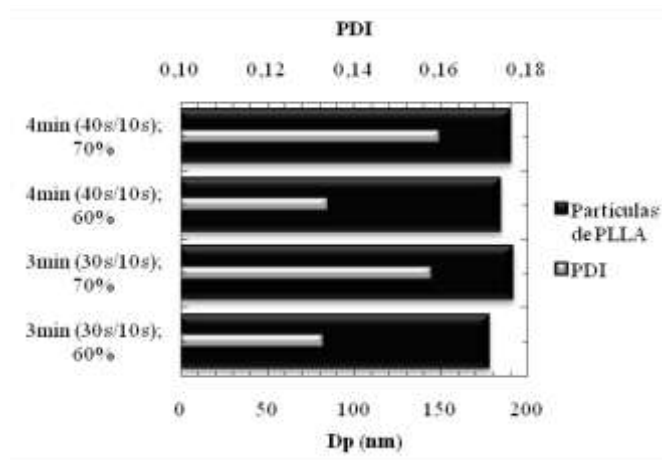
Analisando as microscopias é possível observar que as nanopartículas apresentam morfologia irregular, sem formato perfeitamente esférico, e distribuição de tamanho estreita, concordando com os resultados de índice de polidispersão determinados para

este experimento pela técnica de difração dinâmica de luz apresentado na Tabela 3.4.

### 3.2.2 Efeito do tempo e amplitude de sonicação

Uma etapa de adição de energia é fundamental para a obtenção de sistemas emulsionados. A fim de avaliar a influência dessa etapa no diâmetro médio das nanopartículas, o tempo e amplitude de sonicação foram variados entre 3 (pulsos de 30s de sonicação e 10 de pausa) e 4min (pulsos de 40s de sonicação e 10 de pausa), e 60 e 70% de amplitude. Os resultados são apresentados na

Figura 3.5. Para todos os experimentos foi utilizado 0,3g de L-PLLA, 0,072g de lecitina, 10g de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e 24g de  $\text{H}_2\text{O}$ .



**Figura 3.5:** Efeito do tempo e amplitude de sonicação no Dp e PDI das nanopartículas de PLLA (0,3g L-PLLA, 0,072g de lecitina, 10g  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e 24g de  $\text{H}_2\text{O}$  foram utilizadas em todos os experimentos).

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o aumento no tempo de sonicação não teve efeito acentuado sobre o diâmetro médio das nanopartículas. Em contrapartida, o aumento da amplitude de sonicação resultou em distribuições mais largas.

O aumento da energia cedida ao sistema com o aumento no tempo e amplitude de sonicação leva à formação de partículas menores (MAINARDES, 2005). Entretanto, muitas vezes o surfactante

adicionado à emulsão não é suficiente para cobrir a alta área superficial das pequenas nanopartículas, que coalescem formando partículas maiores de variados diâmetros, resultando em distribuições mais largas.

O efeito do processo de preparação das nanopartículas sobre a massa molar do PLLA também foi avaliado. Foram analisadas amostras da miniemulsão antes e depois da sonicação e logo após a evaporação do solvente orgânico para verificar a ocorrência de redução da massa molar devido à degradação do polímero durante o processo de obtenção. Os resultados são apresentados na Tabela 3.6. Para a preparação de todas as miniemulsões foi utilizado 0,3g de L-PLLA ( $M_w = 11.500$  g/mol), 0,072g de lecitina, 10g de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e 24g de  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Tabela 3.6:** Efeito do processo de preparação das nanopartículas (sonicação e evaporação do solvente orgânico) sobre a massa molar do L-PLLA (0,3g L-PLLA ( $M_w = 11.500$  g/mol), 0,072g de lecitina, 10g  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e 24g de  $\text{H}_2\text{O}$  foram utilizadas em todos os experimentos).

Condição de Sonicação	Etapas do Processo	$M_w$ (g/mol)	$M_n$ (g/mol)	$M_w/M_n$
3min (30s/10s); A = 60%	Antes Sonicação	11.451	7.421	1,543
	Após Sonicação	11.204	7.219	1,552
	Após Evaporação	11.253	7.279	1,546
3min (30s/10s); A = 70%	Antes Sonicação	11.427	7.334	1,558
	Após Sonicação	11.422	7.352	1,553
	Após Evaporação	11.489	7.398	1,553
4min (40s/10s); A = 60%	Antes Sonicação	11.500	7.412	1,551
	Após Sonicação	11.521	7.428	1,551
	Após Evaporação	11.542	7.443	1,551
4min (40s/10s); A = 70%	Antes Sonicação	11.451	7.347	1,563
	Após Sonicação	11.536	7.421	1,554
	Após Evaporação	11.583	7.485	1,548

Os resultados obtidos mostram que o processo de síntese das nanopartículas não induz a degradação do polímero, independentemente do regime de sonicação adotado. Segundo Musyanovych *et al.* (2008), os polímeros de baixa massa molar são menos suscetíveis à degradação induzida pelo processo de sonicação em relação àqueles de massa molar elevada.

### 3.2.3 Efeito da massa molar do PLLA

Outro fator importante na preparação das nanopartículas é a massa molar do polímero. Foram utilizados PLLAs de duas massas molares médias:  $M_w = 11.500 \text{ g/mol}$  (L-PLLA) e  $M_w = 67.400 \text{ g/mol}$  (H-PLLA). As nanopartículas foram preparadas segundo o Método 2 (surfactante lipofílico) com 0,3g de PLLA, 0,072g de lecitina, 10g de diclorometano e 24g de água destilada. O efeito da massa molar no diâmetro médio (Dp) e PDI estão apresentados na Tabela 3.7.

**Tabela 3.7:** Efeito da massa molar do PLLA sobre Dp e PDI das gotas polímero-solvente orgânico e nanopartículas de PLLA (0,3g PLLA, 0,072g de lecitina, 10g  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e 24g de  $\text{H}_2\text{O}$  foram utilizadas em todos os experimentos).

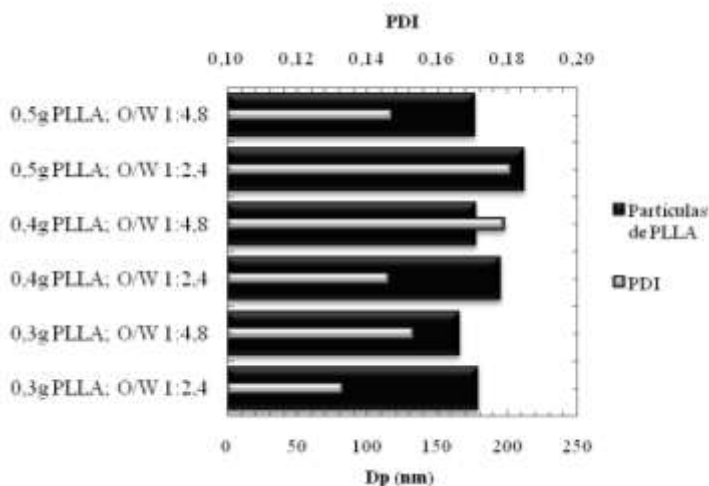
PLLA ( $M_w$ )	Gostas polímero-solvente orgânico		Partículas de PLLA	
	Dp (nm)	PDI	Dp (nm)	PDI
L-PLLA (11.500 g/mol)	392	0,401	178	0,133
H-PLLA (67.400 g/mol)	456	0,377	213	0,119

A massa molar mostrou influência sobre o tamanho das miniemulsões. O menor diâmetro médio foi obtido para o PLLA de baixa massa molar. O mesmo efeito no diâmetro médio em função da massa molar foi observado por Leimann (2011) e Musyanovych *et al.* (2008). O aumento da massa molar leva ao aumento da viscosidade da fase orgânica, resultando em um processo de dispersão menos eficiente e em gotas maiores (GASPAR *e. al.*, 1998; MITTAL *et al.*, 2007).

### 3.2.4 Efeito da concentração de PLLA e razão fase orgânica/fase aquosa

A razão entre a massa de fase orgânica e de fase aquosa (O/W), bem como a concentração de PLLA na fase orgânica têm efeito sobre a estabilidade da miniemulsão e influenciam o tamanho médio das partículas. De modo a avaliar esse efeito, foram preparadas miniemulsões com diferentes quantidades de PLLA (0,3, 0,4 e 0,5g) e de fase aquosa (24 e 48g de água, respectivamente razão mássica O/W 1:2,4 e 1:4,8). Os resultados obtidos para o diâmetro médio (Dp) e PDI (índice de polidispersão) das nanopartículas estão apresentados na

Figura 3.6. Em todos os experimentos foi utilizado 0,072g de lecitina e 10g de diclorometano.



**Figura 3.6:** Efeito da concentração de PLLA e razão mássica fase orgânica/fase aquosa (O/W) no Dp e PDI das nanopartículas (L- PLLA, 0,072g de lecitina e 10g  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  foram utilizadas em todos os experimentos).

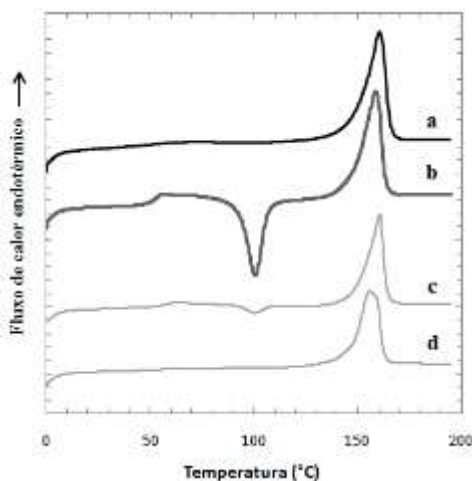
A partir dos resultados é possível observar dois comportamentos distintos: (a) uma pequena diminuição do tamanho de partícula e aumento do PDI com a diminuição da razão fase orgânica/fase aquosa e, (b) um aumento do Dp e PDI com o aumento da concentração de PLLA para razões O/W 1:2,4 (o aumento da concentração de PLLA para razões O/W 1:4,8 não afetou de forma significativa o diâmetro médio das miniemulsões). Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores (Mainardes (2005), Leimann (2011), Musyanovych *et al.* (2008) e Quintanar-Guerrero *et al.* (1996)). O aparente mecanismo responsável por estes fenômenos é (I) o maior distanciamento entre as nanopartículas devido o aumento do volume de fase aquosa, tornando o processo de coalescência menos eficiente e resultando em partículas menores, e (II) a elevação da resistência às forças de cisalhamento devido ao aumento da viscosidade da fase orgânica com o aumento da concentração de polímero, levando à formação de partículas maiores (MAINARDES, 2005; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1996). Todavia, o aumento do volume reacional total leva a diminuição da eficiência de sonicação, que é traduzida em distribuições de tamanho mais largas.



### 3.2.5 Caracterização das nanopartículas por DSC

Propriedades poliméricas como a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ) e temperatura de cristalização ( $T_c$ ) podem afetar a taxa de liberação do fármaco e a degradação do polímero. Nesse sentido, para avaliar se o processo de síntese das nanopartículas pode alterar as propriedades do polímero, determinou-se a  $T_g$ ,  $T_c$  e  $T_m$  do L-PLLA ( $M_w = 11.500$  g/mol) em sua forma purificada (livre de monômero residual) e de nanopartículas de L-PLLA sintetizadas através do Método 2 (surfactante lipofílico), utilizando 0,3g de L-PLLA, 0,072g de lecitina, 10g de diclorometano e 24g de água destilada.

A Figura 3.7 apresenta as curvas de DSC do primeiro e segundo aquecimento para o L-PLLA puro (a, b) e para as nanopartículas de L-PLLA (c, d) determinados através da técnica de DSC. Os detalhes da  $T_g$ ,  $T_c$ ,  $T_m$ , Entalpias de cristalização ( $\Delta H_c$ ) e fusão ( $\Delta H_m$ ) e grau de cristalinidade ( $\chi_c$ ) estão resumidos na Tabela 3.8.



**Figura 3.7:** Curvas de DSC do primeiro e segundo aquecimento para o L-PLLA (a, b, respectivamente) e para nanopartículas de L-PLLA, (c, d, respectivamente).

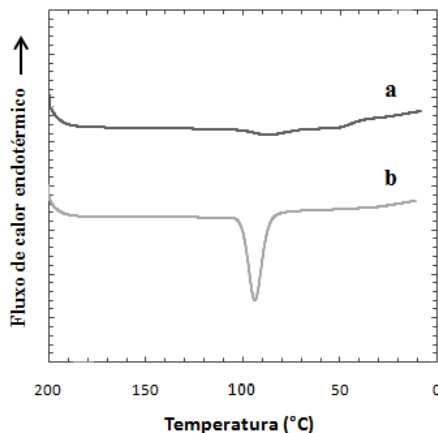
**Tabela 3.8:** Temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), cristalização ( $T_c$ ) e fusão cristalina ( $T_m$ ), Entalpias de cristalização ( $\Delta H_c$ ) e fusão cristalina ( $\Delta H_m$ ) e grau de cristalinidade ( $\chi_c$ ) do PLLA puro e de nanopartículas de PLLA.

Polímero	Aquecimento	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$\Delta H_m$ (J/g)	$\chi_c$ (%)
L-PLLA	1°	54	-	160	-	58,5	62,4
	2°	52	100	158	-32,5	48,9	52,2
Partículas de PLLA	1°	56	100	160	-3,3	46,7	49,8
	2°	50	-	155	-	50,7	53,1

Nestas análises de DSC foi mais difícil observar a  $T_g$  nos termogramas do primeiro aquecimento para o L-PLLA (Figura 3.7a) e segundo aquecimento para as nanopartículas (Figura 3.7d), fato que pode ser atribuído a pouca mobilidade das cadeias poliméricas, resultado do alto grau de empacotamento cristalino (FERREIRA, 2001).

Devido ao alto grau de cristalinidade do polímero, um pico endotérmico de fusão é observado em 160°C no termograma do primeiro aquecimento para o L-PLLA (Figura 3.7a). Na curva obtida para o segundo aquecimento (Figura 3.7b), três eventos podem ser claramente observados. O primeiro é a transição vítrea (52°C), seguido por um pico exotérmico de cristalização (100°C) e, por último, o pico de fusão cristalina. A nitidez da  $T_g$  e o aparecimento da  $T_c$  se devem ao rápido resfriamento, situação na qual não há tempo suficiente para a acomodação completa das cadeias poliméricas e recristalização durante a etapa de resfriamento.

Os termogramas das nanopartículas de L-PLLA apresentam comportamento diferente daquele observado para o L-PLLA puro. É possível observar a transição vítrea (56°C) e os picos exotérmico de cristalização (100°C) e endotérmico de fusão cristalina (160°C) no primeiro aquecimento, e apenas a  $T_g$  (50°C) e  $T_m$  (155°C) no segundo. A presença da  $T_c$  na curva do primeiro ciclo de aquecimento pode ser atribuída à perda parcial de cristalinidade durante o processo de síntese das nanopartículas, como pode ser observado através da diminuição do grau de cristalinidade da amostra de 62,4 para 49,8% após a preparação das nanopartículas. A ausência da  $T_c$  no segundo aquecimento se deve à recristalização das cadeias poliméricas durante o processo de resfriamento, como pode ser observado na Figura 3.8.



**Figura 3.8:** Curvas de DSC do primeiro resfriamento para (a) o L-PLLA e (b) para nanopartículas de L-PLLA.

De maneira geral, o processo de preparo das nanopartículas teve influência sobre as propriedades térmicas do L-PLLA, principalmente em relação ao grau de cristalinidade do polímero. A temperatura de fusão cristalina não apresentou variação acentuada ( $152\text{-}160^{\circ}\text{C}$ ), entretanto, houve uma diminuição na entalpia de fusão cristalina e no grau de cristalinidade do polímero, indicando que houve perda parcial de cristalinidade do PLLA durante a preparação das nanopartículas.

### 3.3 CONCLUSÕES

Nanopartículas de PLLA foram obtidas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. Foi avaliado o comportamento das miniemulsões mediante diferentes condições de processo, entre elas o tipo de surfactante e solvente orgânico, a concentração e a massa molar do polímero, bem como os parâmetros de sonicação. Os resultados obtidos mostraram que todos os surfactantes testados, com exceção da lecitina e PVP-40 em clorofórmio, levaram à formação de miniemulsões estáveis, sendo os menores Dp e PDI obtidos para as nanopartículas preparadas com SDS e lecitina em diclorometano. Também foi possível verificar que, de modo geral, o clorofórmio resultou em nanopartículas maiores com distribuições de tamanho mais largas. Este comportamento é atribuído ao aumento da coalescência entre as gotas de polímero-solvente orgânico quando

utilizado o clorofórmio, visto que este apresenta uma maior tensão interfacial com a água em relação ao diclorometano.

Ao variar a massa molar e concentração de PLLA, verificou-se um aumento do Dp, além do alargamento da distribuição de tamanhos devido ao aumento da viscosidade da fase orgânica. A razão mássica entre a fase orgânica e aquosa (O/W) também mostrou efeito sobre o tamanho das nanopartículas. O maior distanciamento entre as partículas proporcionado pelo aumento da quantidade de água utilizada (diminuição da razão O/W) tornou o processo de coalescência menos eficiente, resultando em partículas menores. O tempo de sonicação não teve efeito significativo sobre a estabilidade das miniemulsões e massa molar do PLLA, ainda que o aumento da amplitude de sonicação tenha resultado em distribuições de tamanho mais largas.

Ao avaliar a influência do processo de obtenção das nanopartículas sobre as propriedades térmicas do PLLA, não foi observado qualquer efeito sobre as temperaturas de transição vítrea, de cristalização e fusão cristalina. Contudo, houve perda parcial da cristalinidade do polímero de 62,4% para 49,8% após a preparação das nanopartículas.

## CAPÍTULO IV

### 4 NANOPARTÍCULAS BLENDA DE PLLA/PMMA E PLLA/PS

Neste capítulo é abordado o estudo relativo ao processo de obtenção de nanopartículas blenda de PLLA/PMMA e PLLA/PS através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente, com ambos os polímeros pré-formados, e via reações de polimerização em miniemulsão e emulsão semeada, utilizando, respectivamente, o PLLA pré formado e nanopartículas de PLLA e os monômeros metacrilato de metila e estireno. Os resultados incluem diâmetro médio, obtido via DLS, morfologia da partícula, obtido através de MET, conversão monômero-polímero, determinada por gravimetria e Cromatografia Gasosa (CG), bem como temperaturas de transição vítrea e de fusão cristalina das misturas PLLA/PMMA, obtidas por DSC.

O poli(metacrilato de metila) e o poliestireno, ambos polímeros derivados de petróleo e com propriedades mecânicas bastante conhecidas e estabelecidas na literatura, foram utilizados como polímeros modelos na tentativa de modificar algumas propriedades do PLLA de modo a tornar os processos de degradação do PLLA e de liberação do fármaco a partir de nanopartículas poliméricas mais lentos.

#### 4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

##### 4.1.1 Materiais

Foram utilizados os monômeros metacrilato de metila (MMA) e estireno (STY, grau técnico e concentração do inibidor p-terc-butilcatecol de 12 ppm fornecido pela Termotécnica Ltda, adquirido da Innova S.A.) na preparação das nanopartículas blenda. O Poli(L-lactídeo) (Mw = 13.700 g/mol, IP = 1,608) foi sintetizado e gentilmente cedido pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). PMMA (Mw = 68.000 g/mol, IP = 3,118) foi sintetizado via polimerização em massa em nosso laboratório. Lecitina (Alfa Aesar) foi utilizada como surfactante. Clorofórmio (Vetec, P.A.) e metanol

(Nuclear, P.A.) foram usados para purificação do PLLA. Para a preparação das nanopartículas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente foi aplicado diclorometano (Fmaia, P.A.) como solvente orgânico. Os iniciadores das reações de polimerização constituem Persulfato de Potássio (KPS, Vetec, P.A.) e 2,2-azo-bis-isobutironitrila (AIBN, 98% puro, Vetec). Para terminar a reação instantaneamente, uma solução contendo 1% de hidroquinona (Nuclear) foi utilizada. Tetróxido de rutênio ( $\text{RuO}_4$ , 0,5% estabilizado - Electron Microscopy Sciences) foi utilizado para o tingimento seletivo das nanopartículas blenda PLLA/PS para análise de MET. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos, exceto o PLLA.

#### **4.1.2 Preparação das Nanopartículas**

##### **4.1.2.1 Purificação do PLLA**

A purificação do PLLA foi realizada de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 3 (item 3.1.2.1).

##### **4.1.2.2 Polimerização em massa do MMA**

Para a síntese das nanopartículas blenda com PMMA através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente foi utilizado PMMA de massa molar ponderal média de 68.000 g/mol ( $\text{IP} = 3,118$ ), preparado por polimerização em massa. Sucintamente, 0,1g de AIBN foi dissolvido, a temperatura ambiente, em 10g de MMA. A mistura foi distribuída em alíquotas de 2,5mL em ampolas de vidro de 12 mL dotadas de tampa com rosca. Em seguida, as mesmas foram vedadas e postas em um banho termostático a 80°C para reagir durante 3 horas. O polímero produzido nesta etapa foi triturado e mantido a 60°C em estufa de convecção forçada por três dias para remoção do monômero residual.

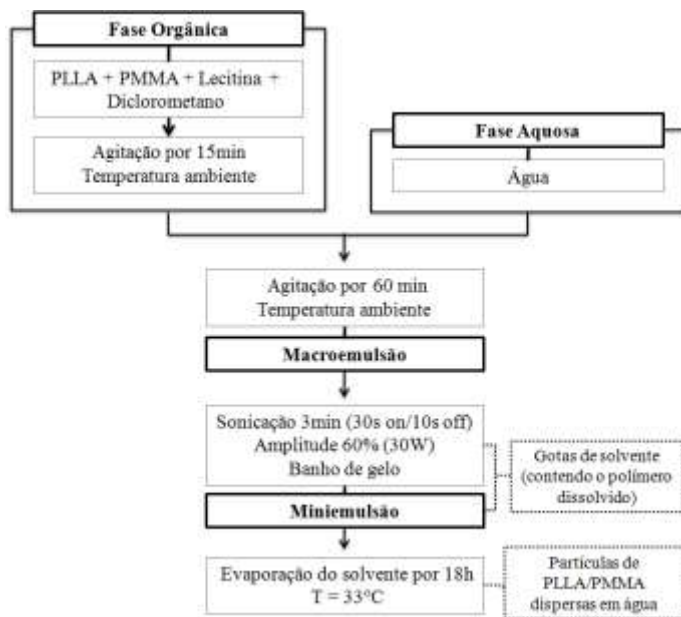
##### **4.1.2.3 Preparação das Nanopartículas de PLLA/PMMA e PLLA/PS**

As nanopartículas blenda de PLLA/PMMA foram obtidas através de três diferentes técnicas: (1) miniemulsificação/evaporação do solvente, onde foram utilizados ambos os polímeros PLLA e PMMA pré-formados; (2) polimerização em miniemulsão, onde o PLLA pré-

formado foi solubilizado em monômero (MMA e STY); e (3) polimerização em emulsão semeada, cujas sementes foram nanopartículas de PLLA. A partir da estratégia (1) foi possível obter miniemulsões estáveis com diferentes proporções mássicas de PLLA/PMMA, que variaram de 1:10 à 10:1. Com a estratégia (2), devido à baixa solubilidade do PLLA em MMA, foi possível incorporar somente até 15% (m/m) de PLLA com relação à massa do monômero. Através da estratégia (3) a razão mássica de PLLA/MMA foi variada de 1:2 à 1:1. Foram utilizados dois tipos de iniciadores, um organossolúvel (AIBN) para as estratégias (2) e (3); e um hidrossolúvel (KPS) para a estratégia (3). As nanopartículas blenda de PLLA/PS foram obtidas via polimerização em miniemulsão, com no máximo 20% (m/m) de PLLA dissolvido em STY.

***Miniemulsificação/Evaporação do Solvente:*** As nanopartículas blenda foram preparadas de acordo com o procedimento descrito no Método 2 (surfactante lipofílico) do Capítulo 3. A fase orgânica foi preparada com a dissolução do PLLA, PMMA, e lecitina em diclorometano sob agitação durante 15min. A fase aquosa, constituída de água destilada, foi adicionada à fase orgânica e misturada por agitação vigorosa durante 60min. Em seguida, a mistura foi sonicada com ultrassom acoplado a uma ponteira (Fischer Scientific, Ultrasonic Dismembrator Model 500, 400W com ponta de ½”) por 3min em um regime de pulso de 30s de sonicação e 10s de pausa e com uma amplitude de 60%, resultando na maioria das preparações uma potência de aproximadamente 30W. Para minimizar o aumento da temperatura durante o processo de dispersão por ultrassom, a miniemulsão foi imersa em banho de gelo. A miniemulsão foi então transferida para um erlenmeyer com capacidade de 250 mL e mantida sob agitação em um Banho Dubinhoff (shaker) a uma temperatura de 33°C por 18h para a evaporação do diclorometano.

A Figura 4.1 apresenta o fluxograma do processo de preparação das miniemulsões através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. A Tabela 4.1 mostra as formulações básicas adotadas na preparação das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente.



**Figura 4.1:** Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente.

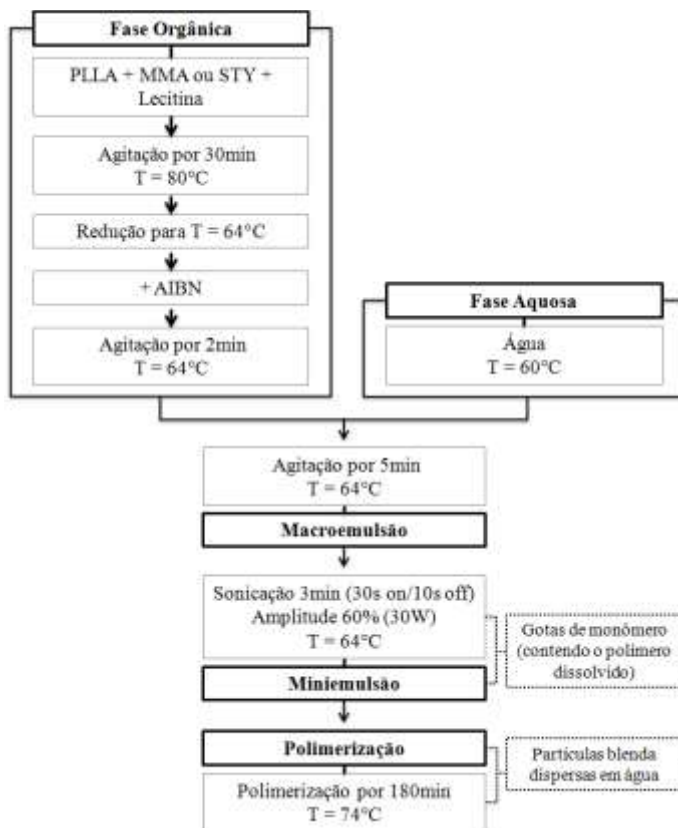
**Tabela 4.1:** Formulações básicas das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA preparadas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente.

Razão PLLA:PMMA	PLLA (g)	PMMA (g)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (g)	Lecitina (g)	H <sub>2</sub> O (g)
1:0	0,3	-	10	0,072	24
10:1	0,273	0,027	10	0,072	24
5:1	0,250	0,050	10	0,072	24
2:1	0,200	0,100	10	0,072	24
1:1	0,150	0,150	10	0,072	24
1:2	0,100	0,200	10	0,072	24
1:5	0,050	0,250	10	0,072	24
1:10	0,027	0,273	10	0,072	24

**Polimerização em Miniemulsão:** A fase orgânica foi preparada com a solubilização do PLLA e lecitina em MMA ou STY em um reator encamisado a 80°C durante 30 minutos sob agitação. A temperatura da camisa foi então reduzida para 64°C e o iniciador AIBN foi adicionado



e misturado por mais 2min. Imediatamente após, a fase aquosa, a 60°C, foi adicionada à fase orgânica e misturada por 5min sob agitação vigorosa. Ainda no reator encamisado a 64°C, a macroemulsão obtida foi sonicada com ultrassom (Fischer Scientific, Ultrasonic Dismembrator Model 500, 400 W com ponta de ½”) por 3min em um regime de pulso de 30s de sonicação e 10s de pausa e com uma amplitude de 60%. Em seguida alíquotas de 2,5mL da miniemulsão foram transferidas para ampolas de vidro de 12 mL dotadas de tampa com rosca. As ampolas foram devidamente vedadas e postas em um banho termostático a 74°C para reagir durante 180 min. A Figura 4.2 apresenta o fluxograma do processo de preparação das nanopartículas blenda PLLA/PMMA e PLLA/PS por polimerização em miniemulsão.



**Figura 4.2:** Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA e PLLA/PS via reação de polimerização em miniemulsão.

Nas Tabela 4.2 e Tabela 4.3 são mostradas as formulações básicas adotadas na preparação das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA e PLLA/PS, respectivamente, via reação de polimerização em miniemulsão.

**Tabela 4.2:** Formulações básicas das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA preparadas via reação de polimerização em miniemulsão.

Experimento	PLLA (g)	MMA (g)	Lecitina (g)	AIBN (g)	H <sub>2</sub> O (g)
PLLA/MMA-10% <sup>a</sup>	0,286	2,857	0,041	0,057	30
PLLA/MMA-15% <sup>a</sup>	0,421	2,810	0,042	0,056	30

<sup>a</sup> Porcentual de PLLA em relação à massa de MMA.

**Tabela 4.3:** Formulações básicas das nanopartículas blenda de PLLA/PS preparadas via reação de polimerização em miniemulsão.

Experimento	PLLA (g)	STY (g)	Lecitina (g)	AIBN (g)	H <sub>2</sub> O (g)
PLLA/STY-10% <sup>a</sup>	0,389	3,889	0,056	0,066	40
PLLA/STY-20% <sup>a</sup>	0,534	2,671	0,042	0,053	30

<sup>a</sup> Porcentual de PLLA em relação à massa de estireno.

**Polimerização em Emulsão Semeada:** As nanopartículas sementes de PLLA foram preparadas através da técnica de miniemulsificação/ evaporação do solvente, segundo descrito no Método 2 (surfactante lipofílico) do Capítulo 3 (item 3.1.2.2). A fase orgânica foi preparada com a dissolução de 0,3g de PLLA e 0,072g de lecitina em 10g de diclorometano. A fase aquosa constituiu de 24g de água destilada.

Foram utilizados dois tipos de iniciador nas reações de polimerização do MMA em emulsão semeada: AIBN e KPS. Para melhor compreensão, os procedimentos adotados para a preparação das emulsões foram divididos de acordo com o iniciador utilizado.

**AIBN:** Em um balão de vidro de fundo redondo com capacidade para 50mL em banho de óleo, o AIBN foi dissolvido em MMA durante 15min. Em seguida, a miniemulsão de nanopartículas de PLLA (sementes) foi adicionada à mistura de monômero e iniciador, e a emulsão obtida foi mantida sob agitação durante 60min em temperatura ambiente para promover o inchamento das nanopartículas com monômero. A temperatura foi elevada para 72°C e a polimerização foi realizada durante 240 minutos.

**KPS:** Em um balão de vidro de fundo redondo com capacidade

para 50mL em banho de óleo, MMA foi misturado à miniemulsão de nanopartículas de PLLA (sementes) e a emulsão obtida foi mantida sob agitação durante 60min em temperatura ambiente para promover o inchamento das nanopartículas com monômero. Em seguida, uma solução de KPS em água destilada foi adicionada à emulsão e a temperatura foi elevada para 80°C. A polimerização foi realizada durante 240 minutos.

A Figura 4.3 apresenta o fluxograma do processo de preparação das nanopartículas blenda PLLA/PMMA via polimerização em emulsão semeada.



**Figura 4.3:** Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA via reação de polimerização em emulsão semeada.

O sistema de aquecimento para as polimerizações consistiu em uma chapa de aquecimento com controle de temperatura e agitação associada a um banho de óleo de silicone. Devido à perda de calor para o ambiente, foi observada uma diferença de 9°C entre a temperatura do banho de óleo e a do meio reacional. Dessa forma, a temperatura do óleo foi mantida em 81°C e 89°C para as polimerizações com AIBN e KPS, respectivamente.

Na Tabela 4.4 são apresentadas as formulações básicas adotadas na preparação das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA via reação de polimerização emulsão semeada. Os valores mássicos de PLLA correspondem à massa total de PLLA na forma de nanopartículas. Cada

formulação foi preparada utilizando 0,3g de PLLA, dessa forma foram preparadas duas bateladas para obter-se 0,6g nanopartículas de PLLA para cada reação. Esse procedimento foi adotado para manter constantes os parâmetros de sonicação.

**Tabela 4.4:** Formulações básicas das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA preparadas via reação de polimerização em emulsão semeada (0,144g de lecitina, 20g  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e 48g de  $\text{H}_2\text{O}$  foram utilizados na preparação das nanopartículas semente).

Razão PLLA:MMA	PLLA <sup>a</sup> (g)	MMA (g)	KPS <sup>b</sup> (g)	AIBN <sup>b</sup> (g)	H <sub>2</sub> O (g)
1:2	0,6	1,20	2% - 0,024	-	6
1:2	0,6	1,20	4% - 0,048	-	12
1:2	0,6	1,20	-	2% - 0,024	-
1:2	0,6	1,20	-	4% - 0,048	-
1:1	0,6	0,60	-	4% - 0,024	-

<sup>a</sup> Nanopartículas de PLLA preparadas via miniemulsificação/evaporação do solvente.

<sup>b</sup> % (m/m) em reação à concentração de monômero.

### 4.1.3 Caracterização das Nanopartículas

#### 4.1.3.1 Diâmetro Médio (Dp) e Índice de Polidispersão (PDI)

O diâmetro médio (em intensidade) e índice de polidispersão das nanopartículas foram determinados através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering – DLS), de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 3 (item 3.1.3.1). As amostras das nanopartículas preparadas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente e polimerização em emulsão semeada foram analisadas sem prévia diluição. Aquelas preparadas via polimerização em miniemulsão foram diluídas na razão volumétrica de 1:3 em água saturada com MMA ou STY.

#### 4.1.3.2 Conversão por Gravimetria

A conversão do monômero em polímero ao longo do tempo das reações de polimerização foi determinada por análise gravimétrica, dada pela razão entre a massa de polímero presente no reator e a massa de monômero alimentada. As amostras foram retiradas do meio reacional

em determinados intervalos de tempo e pesadas em cápsulas de papel alumínio contendo uma solução inibidora da reação de hidroquinona (1% m/v). A massa de polímero foi calculada a partir do resíduo seco obtido pela evaporação do látex adicionado às cápsulas de alumínio em uma estufa de convecção forçada a 60°C por 24 horas, da qual é subtraída a massa de sólidos não poliméricos (surfactante e iniciador), e a massa de PLLA e hidroquinona adicionada.

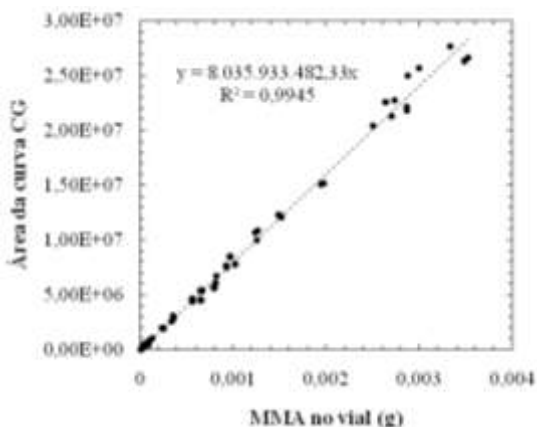
#### 4.1.3.3 Conversão por Cromatografia Gasosa

A conversão do monômero em polímero de algumas reações de polimerização também foi determinada por Cromatografia Gasosa (CG). O teor de monômero no látex foi determinado usando a técnica de evaporação total das amostras, onde a fração volátil da amostra é totalmente vaporizada antes de ser injetada na coluna. Os parâmetros utilizados no cromatógrafo gasoso para preparação da curva de calibração e para a análise das amostras estão apresentados na Tabela 4.5.

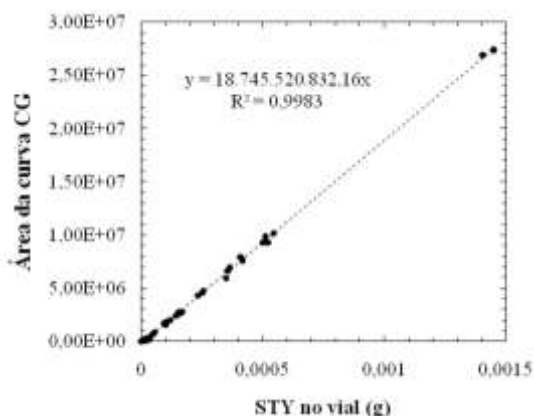
**Tabela 4.5:** Parâmetros do CG utilizados para determinação do teor de monômero no látex.

<b>Parâmetros</b>	<b>Descrição</b>
Equipamento	Shimadzu GC-2010AF
Forno Headspace	Shimadzu AOC-5000
Coluna capilar	RTX-5 (sílica fundida 5% difenil/95% dimetilpolisiloxano), Restek (30m x 0,25mm di x filme 0,25µm)
Gás de arraste	Nitrogênio
Fluxo do gás de arraste	1,39 mL/min
Temperatura detector	220°C
Temperatura injeção	200°C
Modo de injeção	Split (1:10)
Temperatura do forno HeadSpace	110°C por 4min, 250rpm
Programação de temperatura do forno	60°C (MMA) e 75°C (STY) (por 5min) até 220°C (por 2min), 20°C/min
Temperatura seringa	120°C
Software utilizado	GC Solution v.2.3, Shimadzu Corporation

A curva de calibração foi preparada com a diluição de um látex estoque de miniemulsão em água destilada. As amostras da curva de calibração foram injetadas em triplicata e uma relação linear entre a massa do monômero e a área do pico integrado dado como resposta no cromatógrafo foi encontrada. Nas Figura 4.4 e Figura 4.5 estão apresentadas as curvas de calibração para o MMA e STY, respectivamente.



**Figura 4.4:** Curva de calibração do metacrilato de metila (MMA).



**Figura 4.5:** Curva de calibração do estireno (STY).

A partir da equação da reta obtida para cada curva de calibração foi possível determinar a quantidade de monômero no látex. A

conversão do monômero em polímero foi determinada da seguinte forma: alíquotas foram retiradas do meio reacional em determinados intervalos de tempo e analisadas em duplicata por cromatografia gasosa. Em cada vial foi adicionado 35µL de látex e 10µL de solução de hidroquinona (1% m/v) para as reações com MMA, e 45µL de látex para as reações com estireno.

A conversão média para cada análise foi calculada com a aplicação dos dados obtidos em cada cromatograma na Equação 4.1.

$$X_m = 1 - \left( \frac{\frac{m_{mV}}{m_V} \times m_{L0}}{m_{m0}} \right) \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Onde:

- $X_m$  - Conversão média;
- $m_{mV}$  - Massa média de monômero no vial, calculada segundo equação da reta (g);
- $m_V$  - Massa média de látex no vial (g);
- $m_{L0}$  - Massa total de látex (massa de monômero + sólidos não poliméricos + água alimentados) (g);
- $m_{m0}$  - Massa de monômero alimentado (g).

#### 4.1.3.4 Temperaturas de Transição Vítrea (Tg)

A temperatura de transição vítrea (Tg) das amostras foi determinada através de Calorimetria Diferencial de Varredura (Differential Scanning Calorimetry – DSC), de acordo como descrito no Capítulo 3 (item 3.1.3.3). Apenas as curvas obtidas no segundo aquecimento são apresentadas.

#### 4.1.3.5 Número de Partículas (Np)

O número de partículas presentes em cada 1g de látex (Np) foi determinado a partir da Equação 4.2, onde  $V_p^1$  é o volume de uma partícula,  $V_p^T$  é o volume total de partículas e  $m_T$  é a massa total do látex.

$$N_P = \left( \frac{V_P^T}{V_P^1} \right) / m_T \quad (\text{Eq. 4.2})$$

A Equação 4.2 pode ser representada a partir dos dados de diâmetro médio e conversão conforme é mostrado na Equação 4.3 para partículas obtidas via polimerização do monômero.

$$N_P = \left[ \frac{\left( \frac{m_m}{\rho_m} \times (1 - X) \right) + \left( \frac{m_m}{\rho_{pol}} \times X \right) + \left( \frac{m_{PLLA}}{\rho_{PLLA}} \right)}{\frac{\pi \times (D_P \times 10^{-7})^3}{6}} \right] / m_T \quad (\text{Eq. 4.3})$$

Onde  $D_P$  é o diâmetro médio das nanopartículas (nm),  $X$  é a conversão,  $\rho$  e  $m$  são densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) e massa (g), respectivamente; e os índices  $m, pol$  e  $PLLA$  indicam monômero, polímero (PMMA) e PLLA, respectivamente. A Tabela 4.6 apresenta o valor das propriedades físicas utilizadas para o cálculo do  $N_P$ .

**Tabela 4.6:** Densidade dos constituintes de uma nanopartícula blenda PLLA/PMMA (dados a 20°C).

Constituinte	Densidade ( $\text{g/cm}^3$ )	Fonte
MMA	0,94	FISPQ, 2012(c).
PMMA	1,16	PINTO; RAY, 1995.
PLLA	1,29	GARLOTTA, 2001.

Cabe mencionar que as Equações 4.2 e 4.3 consideram que as partículas sejam esféricas e uniformes, assumindo que o monômero não reagido encontra-se predominantemente nas partículas poliméricas, caso das reações de polimerização em miniemulsão e polimerização em emulsão semeada com conversão elevada e sem diluição das amostras para medida de diâmetro médio.

#### 4.1.3.6 Morfologia

A caracterização morfológica das partículas poliméricas submicrométricas foi feita através da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de acordo como descrito no Capítulo 3 (item 3.1.3.4). As amostras para análise das nanopartículas dos



polímeros pré-formados foram preparadas sem diluição (teor de sólidos de 1,55%) e gotejadas sobre grades de cobre de 300 mesh/m<sup>2</sup> previamente recobertas com filme de parlódio. As amostras para análise dos látices das polymerizações em miniemulsão e emulsão semeada foram preparadas com diluição de 1:4 e 1:1, respectivamente em água destilada e gotejadas sobre grades de cobre de 300 mesh/m<sup>2</sup> ou 400 mesh/m<sup>2</sup> previamente recobertas com filme de parlódio. As nanopartículas de PLLA/PS obtidas via polymerização em miniemulsão foram tingidas com vapor de tetróxido de rutênio durante 4 horas em recipiente fechado. Os grids (grades) com amostras das blendas PLLA/PMMA foram recobertas com carbono antes da análise.

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A mistura entre dois ou mais polímeros é considerada uma alternativa econômica para o desenvolvimento de novos materiais, se comparada à síntese de novos polímeros, cujo custo é mais elevado. Através da escolha apropriada e da composição dos polímeros da blenda polimérica, um material com características específicas pode ser obtido. (QUENTAL *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2003).

### 4.2.1 Nanopartículas blenda de PLLA/PMMA

#### 4.2.1.1 Miniemulsificação/evaporação do solvente

Os resultados de diâmetro médio (Dp) e índices de polidispersão (PDI) obtidos antes e após a evaporação do solvente orgânico para os experimentos da Tabela 4.1 estão apresentados na Tabela 4.7. Em todos os experimentos foi utilizado 0,3g de polímero (soma das massas de PLLA e PMMA).

Os resultados mostram que é possível obter miniemulsões estáveis com distribuição de tamanho estreita utilizando variadas proporções mássicas de PLLA e PMMA. Pode-se observar uma tendência ao aumento do tamanho médio das nanopartículas e do índice de polidispersão com o aumento da concentração mássica de PMMA na blenda. Estes resultados estão relacionados com o aumento da viscosidade da fase orgânica devido à maior quantidade de PMMA adicionado, que apresenta massa molar ponderal média quase cinco vezes maior que do PLLA. Comportamento semelhante foi obtido no

Capítulo 3 (item 3.2.4) na preparação de nanopartículas de PLLA utilizando polímero com diferentes massas molares. O aumento da viscosidade dificulta a dispersão da fase orgânica, resultando em gotas com diâmetros maiores e, conseqüentemente, em partículas maiores.

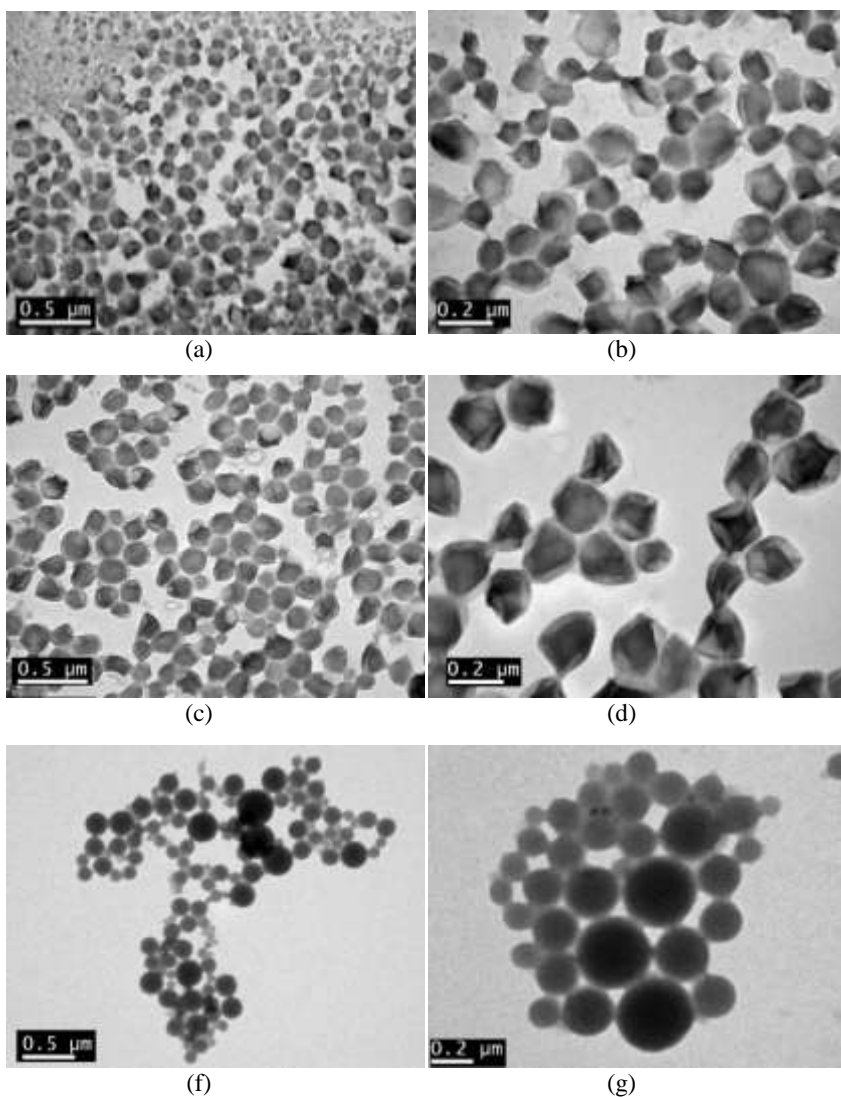
**Tabela 4.7:** Efeito proporção mássica dos polímeros no Dp e PDI das gotas polímero-solvente orgânico e nanopartículas blenda de PLLA/PMMA (0,3g de polímero, 0,072g de lecitina, 10g de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e 24g de  $\text{H}_2\text{O}$  foram utilizadas em todos os experimentos).

Razão PLLA:PMMA	Gostas polímero- solvente orgânico		Partículas de PLLA/PMMA	
	Dp (nm)	PDI	Dp (nm)	PDI
1:0	380	0,381	176	0,104
10:1	362	0,370	175	0,081
5:1	351	0,388	177	0,114
2:1	399	0,348	190	0,115
1:1	426	0,408	199	0,121
1:2	442	0,434	212	0,122
1:5	651	0,484	263	0,209
1:10	462	0,447	200	0,139

A Figura 4.6 apresenta as micrografias (MET) das nanopartículas de PLLA (idem Figura 3.4) e blenda de PLLA/PMMA com proporção mássica de 5:1 (0,250g de PLLA e 0,050g de PMMA) e 1:1 (0,150g de cada polímero) preparadas pela técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente.

A partir das micrografias da Figura 4.6c-d observa-se nanopartículas com proporção de PLLA/PMMA 5:1 com morfologia semelhante a uma bola murcha, sem formato perfeitamente esférico, possivelmente devido a uma lenta evaporação do solvente orgânico durante o processo de obtenção das nanopartículas. O tipo de morfologia encontrado é bastante semelhante ao encontrado para as nanopartículas de PLLA puro (Figura 4.6a-b), indicando a formação de uma mistura homogênea, uma vez que não é possível observar a segregação de fase dos polímeros. De maneira semelhante, a morfologia da blenda com proporção mássica de 1:1 (Figura 4.6f-g) também indica a formação de uma blenda miscível, porém, com partículas de formato esférico. O tamanho de partícula observado nas imagens de MET está condizente com os valores determinados por DLS. O aumento do PDI com o

aumento da concentração de PMMA na blenda apontado pelas medidas de DLS também pode ser observado nas imagens.



**Figura 4.6:** Micrografias de MET das nanopartículas de (a, b) PLLA e blenda de PLLA/PMMA obtidas via técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente com razões mássicas de (c, d) 5:1 e (f, g) 1:1.

#### 4.2.1.2 Polimerização em Miniemulsão

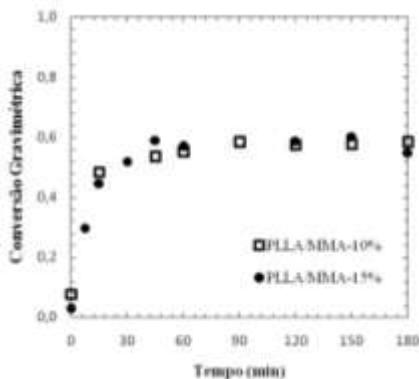
Foram testadas duas formulações para as reações de polimerização em miniemulsão do metacrilato de metila: com 10 e 15% de PLLA dissolvido em monômero. Os resultados obtidos ao fim de 180min de reação para o diâmetro médio (Dp) e índice de polidispersão (PDI) estão apresentados na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8:** Efeito concentração mássica de PLLA no Dp e PDI das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA obtidas por polimerização em miniemulsão.

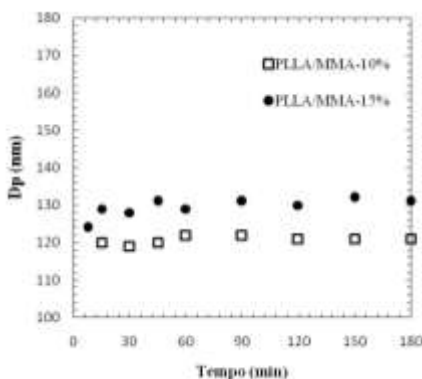
Experimento	PLLA	AIBN	Partículas de PLLA/PS	
			Dp (nm)	PDI
PLLA/MMA-10%	10%	2%	121	0,221
PLLA/MMA-15%	15%	2%	131	0,269

A variação da concentração de PLLA dissolvida não teve influência acentuada sobre diâmetro médio das nanopartículas. Em contrapartida, houve um pequeno aumento do índice de polidispersão. Esse comportamento pode ser atribuído à redução da eficiência de sonicação devido ao aumento da viscosidade da mistura PLLA-monômero resultante da maior concentração de PLLA dissolvida em MMA.

O efeito da concentração de PLLA nas cinéticas de polimerização do metacrilato de metila em miniemulsão pode ser visualizado na Figura 4.7. A evolução do diâmetro médio das nanopartículas durante as reações é apresentada na Figura 4.8. Pelo que se pode observar, o comportamento das reações não foi afetado pela variação da concentração de PLLA. Também é possível observar que ambas as reações apresentam cinéticas bastante rápidas, entretanto alcançaram no máximo 60% de conversão. O tamanho das nanopartículas também não parece ter sofrido influência pela quantidade de PLLA dissolvida, ainda que o aumento do índice de polidispersão apresentado na Tabela 4.11 indique que houve uma maior dificuldade de dispersão devido ao aumento da viscosidade da mistura monômero-PLLA.

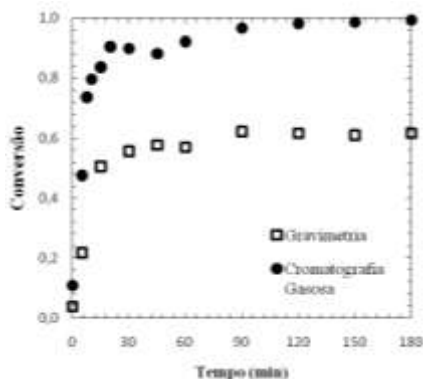


**Figura 4.7:** Efeito da concentração de PLLA nas cinéticas de polimerização do metacrilato de metila em miniemulsão (conversão gravimétrica).



**Figura 4.8:** Efeito da concentração de PLLA no diâmetro médio das nanopartículas blenda de PLLA/PPMMA durante as reações de polimerização em miniemulsão.

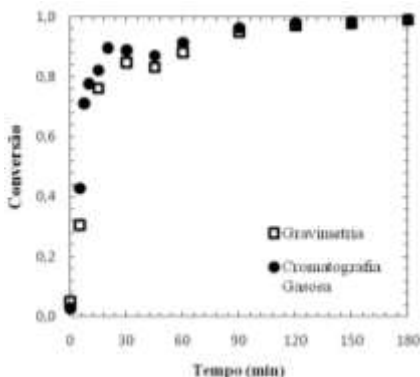
A evolução da conversão durante as reações de polimerização é característico de reações que apresentam conversões próximas a 100%. Isto indica que parte do monômero alimentado pode ter sido perdida por evaporação durante o processo de preparo da miniemulsão, visto que praticamente toda a etapa de preparação das nanopartículas é realizada a 64°C. Nesse contexto, o experimento PLLA/MMA-10% foi repetido e a conversão acompanhada por gravimetria e cromatografia gasosa. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.9.



**Figura 4.9:** Cinética de polimerização em miniemulsão do metacrilato de metila com conversão acompanhada por gravimetria e cromatografia gasosa (réplica da reação PLLA/MMA-10%).

Pelas análises de cromatografia gasosa é possível determinar a concentração de monômero no meio reacional, enquanto que pela gravimetria obtêm-se a concentração de polímero. A curva obtida através da cromatografia gasosa indica que a reação de polimerização alcançou conversões muito próximas a 100%. No tempo de 0 min a amostra aponta um déficit de 15% na quantidade de monômero em relação àquela alimentada devido à evaporação e/ou polimerização prematura durante o processo de preparação da miniemulsão. Existe uma defasagem de aproximadamente 40% entre as conversões determinadas por gravimetria e cromatografia gasosa, dado ao fato de os cálculos não levarem em consideração a fração de monômero perdida. Quando se considera as frações de monômero evaporada e polimerizada durante o preparo da miniemulsão, é possível corrigir a defasagem das curvas obtidas por cada método.

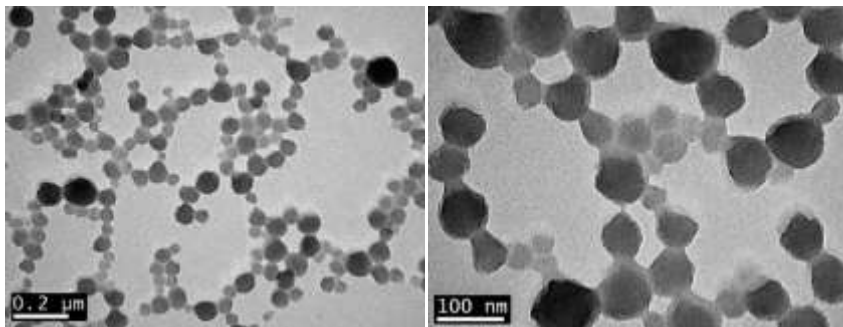
A partir das concentrações de polímero e de monômero determinadas para cada ponto, pode-se calcular a fração de monômero que evaporou. Assim, os dados de conversão podem ser corrigidos para desconsiderar a quantidade de monômero evaporado durante o preparo da miniemulsão, calculada como sendo a diferença entre a quantidade teórica de monômero e a soma da massa de PMMA formada (determinada por gravimetria) e de MMA não reagido (determinado por cromatografia gasosa). Os resultados podem ser observados na Figura 4.10.



**Figura 4.10:** Cinéticas corrigidas de polymerização em miniemulsão do metacrilato de metila (réplica da reação PLLA/MMA-10%).

Após a correção, as curvas das cinéticas de polymerização apresentaram valores muito próximos e alcançaram aproximadamente 100% de conversão. De acordo com a Figura 4.10 a cinética é mais rápida nos primeiros 20 minutos de reação, quando é atingido em torno de 80% de conversão. Os valores para o ponto de 0 min indicam que aproximadamente 4% do monômero polymerizou prematuramente durante o preparo da miniemulsão, uma vez que, quando o AIBN é adicionado, a macroemulsão encontra-se 64°C. Devido à evaporação do monômero, pode-se estimar que a proporção mássica final de PLLA tenha alcançando um valor intermediário a 10 e 15% em relação à massa de PMMA.

As micrografias (MET) das nanopartículas obtidas por polymerização em miniemulsão com 15% (m/m) de PLLA em reação ao MMA estão apresentadas na Figura 4.11. O tipo de morfologia das nanopartículas blenda obtidas por polymerização em miniemulsão não está bastante clara nas micrografias da Figura 4.11, entretanto, aparentemente houve a formação de nanopartículas com estrutura do tipo casca-núcleo, possivelmente com um núcleo rico em PMMA e uma fina casca de PLLA. Para entender melhor estes resultados, faz-se necessário medir o ângulo de contato e a tensão interfacial dos polímeros com a água, porém não foi possível obter estes dados para o PLLA, pois a amostra após seca tornou-se quebradiça.



**Figura 4.11:** Micrografias de MET das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA com 15% (m/m) de PLLA em relação ao MMA obtidas via polimerização em miniemulsão.

A mudança na morfologia em relação às nanopartículas blenda obtidas por miniemulsificação/evaporação do solvente será discutida junto às análises de DSC.

#### 4.2.1.3 Polimerização em Emulsão Semeada

Os resultados de diâmetro médio ( $D_p$ ), índices de polidispersão (PDI) e conversão gravimétrica média obtidos para as partículas sementes e nanopartículas blenda referentes aos experimentos da Tabela 4.4 estão apresentados na Tabela 4.9. O número médio de partículas ( $N_p$ ) em 1g de látex para as nanopartículas sementes e blendas é apresentado na Tabela 4.10. A cinética de polimerização das reações não foi acompanhada. A conversão do monômero foi determinada, em triplicata, apenas no final da reação, após 240 minutos. Optou-se por seguir este procedimento para minimizar a perda de monômero durante a retirada das amostras.

O tipo de iniciador empregado nas reações de emulsão não influenciou de forma acentuada a conversão final do monômero em polímero, exceto quanto utilizado 2% de AIBN. Por outro lado, teve grande influência sobre o tamanho médio, índice de polidispersão e no número de partículas. De modo geral, ambos os iniciadores promoveram a diminuição do  $D_p$  e o aumento do PDI e  $N_p$  em relação aos valores iniciais das sementes de PLLA, sendo que partículas menores e distribuições mais largas, bem como um maior aumento do número de partículas, foram obtidas quando o KPS (hidrossolúvel) foi utilizado como iniciador. Este comportamento pode ser atribuído à nucleação de



novas partículas de polímero pelo mecanismo de nucleação homogênea e/ou micelar. Ainda que a nucleação homogênea seja menos favorecida pela utilização de um iniciador organossolúvel, os resultados obtidos para as reações com AIBN parecem indicar que também houve formação de novas partículas, porém em intensidade bastante inferior ao observado para as reações com KPS.

**Tabela 4.9:** Efeito concentração mássica de PLLA e iniciador no Dp e PDI das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA obtidas por polimerização em emulsão semeada.

Razão PLLA/MMA	Iniciador <sup>a</sup> (%)	Conversão (%)	Desvio Padrão	Sementes de PLLA		Partículas de PLLA/PMMA	
				Dp (nm)	PDI	Dp (nm)	PDI
1:2	2 (KPS)	88,5	0,02	176	0,125	105	0,253
1:2	4 (KPS)	92,6	0,14	194	0,133	112	0,228
1:2	2 (AIBN)	67,7	0,01	177	0,131	148	0,148
1:2	4 (AIBN)	89,0	0,01	196	0,117	159	0,180
1:1	4 (AIBN)	90,3	0,03	173	0,137	152	0,135

<sup>a</sup> Em relação à massa de monômero.

**Tabela 4.10:** Efeito concentração mássica de PLLA e iniciador no Np nas sementes de PLLA (Nps) e nanopartículas blenda de PLLA/PMMA (Npb) obtidas por polimerização em emulsão semeada.

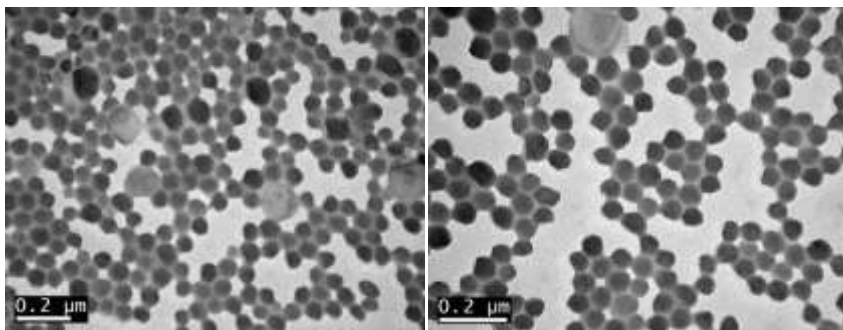
Razão PLLA/MMA	Iniciador <sup>a</sup> (%)	Np (em 1g de látex)		$\frac{N_{pb}}{N_{ps}}$
		Sementes de PLLA ( $N_{ps}$ )	Partículas de PLLA/PMMA ( $N_{pb}$ )	
1:2	2 (KPS)	$3,27 \times 10^{12}$	$5,16 \times 10^{13}$	15,78
1:2	4 (KPS)	$2,52 \times 10^{12}$	$3,73 \times 10^{13}$	14,80
1:2	2 (AIBN)	$3,18 \times 10^{12}$	$2,08 \times 10^{13}$	6,54
1:2	4 (AIBN)	$2,41 \times 10^{12}$	$1,62 \times 10^{13}$	6,72
1:1	4 (AIBN)	$3,21 \times 10^{12}$	$1,20 \times 10^{13}$	3,74

<sup>a</sup> Em relação à massa de monômero.

A proporção de PLLA/PMMA também não exerceu efeito sobre as conversões finais e no tamanho médio das nanopartículas. Em contrapartida, maiores conversões foram alcançadas quando foi utilizado iniciador em concentrações iguais a 4%.

A Figura 4.12 apresenta as micrografias (MET) das nanopartículas blenda PLLA/PMMA preparadas via polimerização em

emulsão semeada utilizando KPS como iniciador na concentração de 4%.



**Figura 4.12:** Micrografias de MET das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA razão mássica de PLLA/PMMA de 1:2 obtidas via polimerização em emulsão semeada com 4% de KPS como iniciador.

É possível observar a partir das imagens de MET, nanopartículas com duas populações de partículas, uma com diâmetro médio inferior a 100nm e outra com  $D_p$  próximo a 180nm. Possivelmente, devido à nucleação de novas partículas, a população de partículas menores é constituída de PMMA e as partículas maiores, predominantemente, de PLLA (partículas sementes). Pode-se, também, observar uma casca difusa cobrindo todas as partículas, que pode ser resultado da degradação parcial dos polímeros com o feixe de elétrons do microscópio ou um efeito da grande quantidade de lecitina utilizada na preparação das nanopartículas (aproximadamente 8% (m/m) em relação à massa de PLLA+MMA). Esta mesma casca difusa também é observada nas nanopartículas preparadas via miniemulsificação/evaporação do solvente, que contêm 24% (m/m) de lecitina em relação à massa de polímero.

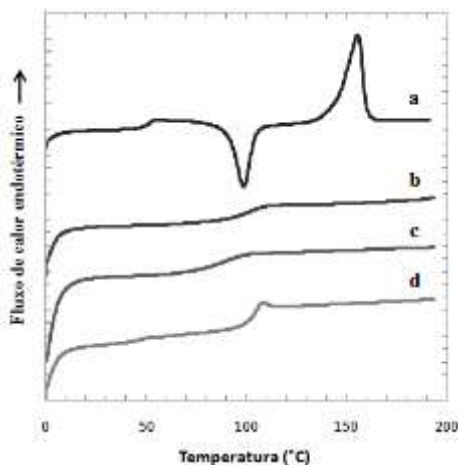
#### 4.2.1.4 Caracterização das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA por DSC

A temperatura de transição vítrea de uma blenda polimérica é um dos critérios mais importantes para determinação da miscibilidade dos componentes da blenda. A miscibilidade entre os polímeros no estado amorfo pode ser detectada pela presença de uma única  $T_g$  intermediária àquelas dos polímeros puros. A imiscibilidade é caracterizada pela

presença de dois valores de  $T_g$  correspondentes a cada polímero (LU; WEISS, 1992).

Para avaliar o efeito do processo de obtenção das nanopartículas nas propriedades térmicas do polímero, bem como para determinar a miscibilidade das blends, determinou-se a  $T_g$  do PLLA em sua forma purificada (livre de monômero residual), do PMMA e de nanopartículas blenda de PLLA/PMMA obtidas via miniemulsificação/evaporação do solvente e polimerização em miniemulsão. As nanopartículas blenda foram preparadas com proporção mássica de PLLA/PMMA e PLLA/MMA igual a 1:5 e 1:10, respectivamente.

A Figura 4.13 apresenta os termogramas do segundo aquecimento para o PLLA puro (a), PMMA puro (b) e para as nanopartículas blenda de PLLA/PMMA obtidas via miniemulsificação/evaporação do solvente (c) e polimerização em miniemulsão (d).



**Figura 4.13:** Curvas de DSC do segundo aquecimento para o (a) PLLA, (b) PMMA e nanopartículas blenda de PLLA/PMMA obtidas via (c) miniemulsificação/evaporação do solvente (1:5) e (d) polimerização em miniemulsão (1:10).

O termograma do PLLA puro (Figura 4.13a) exibe um evento em 52°C ( $T_g$ ), um pico exotérmico em 100°C e um pico endotérmico em 158°C referentes à temperatura de cristalização ( $T_c$ ) e temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ), respectivamente. Em contrapartida, o termograma do PMMA puro (Figura 4.13b) apresenta um único evento térmico ( $T_g$ ) em 100,0°C típico dos polímeros amorfos. Os detalhes da  $T_g$ ,  $T_c$  e  $T_m$  estão resumidos na Tabela 4.11.

**Tabela 4.11:** Temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), cristalização ( $T_c$ ) e fusão cristalina ( $T_m$ ) do PLLA e PMMA puros, e de nanopartículas blenda de PLLA/PMMA obtidas via miniemulsificação/evaporação do solvente (mini/evap) e reação de polimerização (polim/mini).

Polímero	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$T_m$ (°C)
PLLA	52	100	158
PMMA	100	-	-
PLLA/PMMA mini/evap	87	-	-
PLLA/PMMA polim/mini	49 e 104	-	-

A presença do PMMA nas nanopartículas blenda teve um efeito negativo na capacidade de cristalização do PLLA. Os termogramas referentes às blendas apresentaram apenas as temperaturas de transição vítrea, apontando para a formação de uma blenda polimérica amorfa. É possível observar na curva das nanopartículas obtidas via miniemulsificação/evaporação do solvente (Figura 4.13c) uma única  $T_g$  em 87°C, indicando a miscibilidade dos polímeros na blenda. Já as nanopartículas obtidas via polimerização em miniemulsão mostraram-se imiscíveis, visto que apresentaram dois eventos térmicos, um a 49°C e o outro em 104°C, referentes às temperaturas de transição vítrea do PLLA e PMMA, respectivamente.

Zhang *et al.*, (2003) observaram que enquanto blendas de PDLLA/PMMA preparadas a partir da precipitação dos polímeros em solução mostraram-se miscíveis, filmes de blendas preparadas a partir da evaporação do solvente orgânico apresentaram-se imiscíveis, indicando que o processo de preparação também exerce efeito na miscibilidade de blendas.

## 4.2.2 Nanopartículas blenda de PLLA/PS

### 4.2.2.1 Polimerização em Miniemulsão

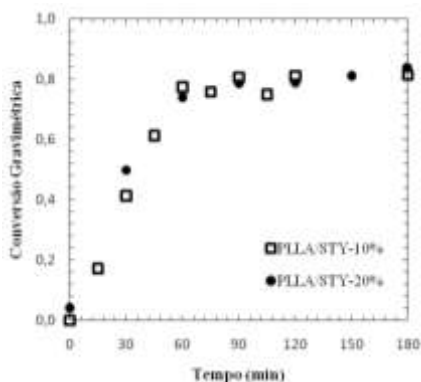
Devido à baixa solubilidade do PLLA em estireno, foi possível solubilizar até 20% (m/m) de PLLA em monômero. Os resultados de diâmetro médio ( $D_p$ ) bem como os índices de polidispersão (PDI) obtidos ao fim de 180 minutos de reação para os experimentos da Tabela 4.3 estão apresentados na Tabela 4.12.

**Tabela 4.12:** Efeito concentração mássica de PLLA no Dp e PDI das nanopartículas blenda de PLLA/PS.

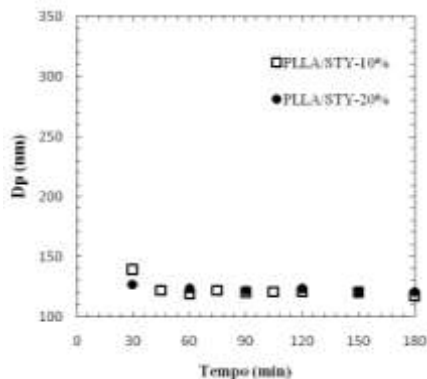
Experimento	PLLA	AIBN	Partículas de PLLA/PS	
			Dp (nm)	PDI
PLLA/STY-10%	10%	2%	117	0,250
PLLA/STY-20%	20%	2%	121	0,281

A variação da concentração de PLLA dissolvida não exerceu efeito acentuado sobre os valores de diâmetro médio e índice de polidispersão obtidos para as nanopartículas blenda de PLLA/PS, que se apresentaram muito próximos.

O efeito da porcentagem de PLLA na cinética de polimerização do estireno em miniemulsão pode ser visualizado na Figura 4.14. A evolução do diâmetro médio das nanopartículas durante ambas as reações é apresentado na Figura 4.15.



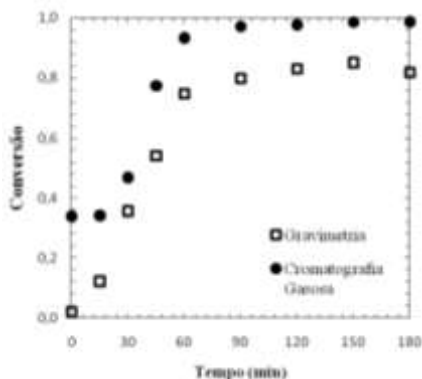
**Figura 4.14:** Efeito da concentração de PLLA nas cinéticas de polimerização do estireno em miniemulsão (conversão gravimétrica).



**Figura 4.15:** Efeito da concentração de PLLA no diâmetro médio das nanopartículas blenda de PLLA/PS nas reações de polimerização em miniemulsão.

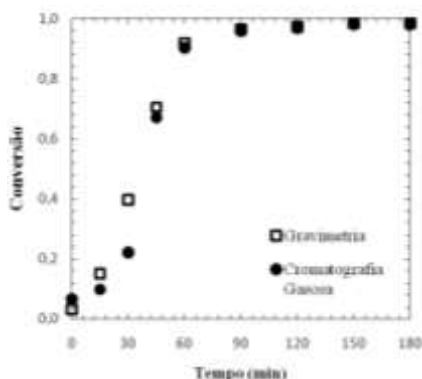
Para as concentrações de PLLA avaliadas, não foram observadas variações importantes nas cinéticas das reações, tampouco nos diâmetros médios das nanopartículas. Ambas as reações alcançaram conversão (determinada por gravimetria) máxima de aproximadamente 80%. Entretanto, como observado nas reações de polimerização com MMA (item 4.2.1.2), pode ocorrer perda de monômero por evaporação, visto que o processo de preparo e sonicação da miniemulsão é realizado a 64°C. Para confirmar esta hipótese, o experimento PLLA/STY-10% foi repetido e a cinética acompanhada por gravimetria e cromatografia gasosa. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.16.

A curva obtida através da cromatografia gasosa indica que a reação de polimerização alcançou conversões muito próximas a 100%. No tempo de 0min a amostra aponta um déficit de 35% na quantidade de monômero em relação àquela alimentada devido à evaporação e/ou polimerização prematura durante o processo de preparação da miniemulsão. Pode ser observada uma defasagem de aproximadamente 20% entre as conversões determinadas por cada método.



**Figura 4.16:** Cinética de polimerização em miniemulsão do estireno com conversão acompanhada por gravimetria e cromatografia gasosa (réplica da reação PLLA/STY-10%).

A fração de monômero que evaporou foi calculada a partir das concentrações de polímero e de monômero determinadas para cada ponto e descontada do valor de monômero alimentado. A partir dos valores obtidos, as conversões foram corrigidas. Os resultados podem ser observados na Figura 4.17.

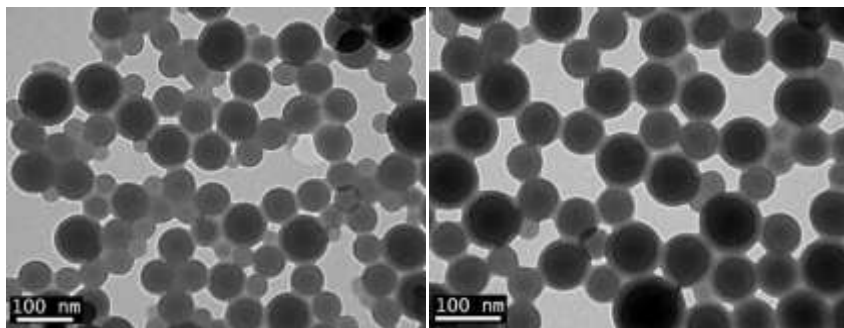


**Figura 4.17:** Cinéticas corrigidas de polimerização em miniemulsão do estireno (réplica da reação PLLA/STY-10%).

As cinéticas de polimerização corrigidas apresentam perfis bastante semelhantes e alcançam valores muito próximos a 100% de conversão após 120 minutos do início da reação. Ambas as cinéticas apontam que aproximadamente 5% do monômero reagiu durante o

preparo das miniemulsões. Uma pequena discrepância entre os pontos iniciais pode ser observada, fato que pode ser atribuído à extrapolação da curva de calibração. Estima-se que, devido à evaporação do monômero, a proporção final de PLLA/PS tenha alcançado valor intermediário a 10 e 15%.

A morfologia das nanopartículas blenda de PLLA/PS com proporção mássica de 1:10 (10% de PLLA em relação ao STY) preparadas via polimerização em miniemulsão pode ser observada nas micrografias apresentadas na Figura 4.18.



**Figura 4.18:** Micrografias de MET das nanopartículas blenda de PLLA/PS (razão mássica 1:10) tingidas com tetróxido de rutênio obtidas via polimerização em miniemulsão.

Pode ser observado nas microscopias da Figura 4.18 nanopartículas com formato esférico. O tipo de morfologia encontrado parece indicar a formação de uma blenda imiscível com estruturas do tipo core-shell, com um núcleo escuro formado por uma fase rica em poliestireno e uma casca fina formada por uma fase rica em PLLA. Os resultados encontrados são condizentes com a literatura, uma vez que vários estudos relatam a imiscibilidade das blends de PLLA/PS (HAMAD; KASEEM; DERI, 2010; LEUNG *et al.*, 2009, ZHOU *et al.*, 2011).

#### 4.3 CONCLUSÕES

Foram preparadas nanopartículas blenda de PLLA/PMMA e PLLA/PS com diâmetro médio entre 100 e 270nm através de três diferentes técnicas: miniemulsificação/evaporação do solvente, polimerização em miniemulsão e polimerização em emulsão semeada. A



morfologia das nanopartículas de PLLA/PMMA e a miscibilidade das blendas poliméricas foram afetadas pelo método de preparo das nanopartículas. As imagens de microscopia (MET) aliadas às temperaturas de transição vítrea (determinadas através de DSC) apontam para a formação de blendas miscíveis, sem segregação de fases via miniemulsificação/evaporação do solvente e imiscíveis por polimerização em miniemulsão. A morfologia encontrada para as nanopartículas de PLLA/PS parece indicar a formação de uma blenda imiscível com estruturas do tipo núcleo-casca, onde um núcleo rico em poliestireno é coberto por uma fina casca de PLLA.

O diâmetro médio e índice de polidispersão foram afetados pelo tipo de iniciador utilizado nas polimerizações em emulsão semeada. Os resultados obtidos indicam que houve a formação de novas partículas poliméricas através da nucleação homogênea e/ou micelar, principalmente nas reações em que o KPS (hidrofílico) foi utilizado. O aumento da proporção de PMMA nas nanopartículas blendas obtidas por miniemulsificação/evaporação do solvente resultou, de maneira geral, no aumento do tamanho médio e no alargamento da distribuição de tamanho de partícula.

A concentração de PLLA dissolvido em monômero (MMA ou STY) não teve influência sobre a cinética de polimerização em miniemulsão para ambas as blendas de PLLA/PMMA e PLLA/PS. As reações apresentaram cinéticas rápidas e alcançaram conversões muito próximas a 100% (após a correção das curvas). Os resultados também revelaram que houve perda de monômero por evaporação durante a preparação das nanopartículas.



## **CAPÍTULO V**

### **5 ENCAPSULAÇÃO DE JVA EM NANOPARTÍCULAS DE PLLA E BLENDA DE PLLA/PMMA**

Este capítulo é referente à encapsulação do JVA em nanopartículas de PLLA e blendas de PLLA/PMMA através das técnicas de miniemulsificação/evaporação do solvente e polimerização em miniemulsão. Foi avaliada a influência da proporção mássica de PLLA/PMMA na eficiência de encapsulação do fármaco e o efeito da adição de JVA na cinética da polimerização em miniemulsão. Os resultados incluem diâmetro médio, obtido via DLS e a caracterização das propriedades térmicas das nanopartículas com JVA realizada através das análises de DSC.

#### **5.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

##### **5.1.1 Materiais**

Foi utilizado poli(L-lactídeo) de duas massas molares ponderais médias:  $M_w = 13.700 \text{ g/mol}$  ( $IP = 1,608$ ) (sintetizado e gentilmente cedido pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)) e  $M_w = 67.400 \text{ g/mol}$  (Sigma-Aldrich), referenciados no texto respectivamente como L-PLLA e H-PLLA. O monômero metacrilato de metila (MMA) foi utilizado na preparação das nanopartículas blenda via polimerização em miniemulsão. PMMA ( $M_w = 68.000 \text{ g/mol}$ ,  $IP = 3,118$ ) foi sintetizado via polimerização em massa em nosso laboratório e utilizado para a preparação das nanopartículas blenda através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. Lecitina (Alfa Aesar) foi utilizada como surfactante. O iniciador utilizado para polimerização foi o 2,2-azo-bis-isobutironitrila (AIBN, 98% puro, Vetec). Hidroquinona (Nuclear) foi utilizada como inibidor (solução 1% em água destilada) na determinação da conversão de monômero em polímero. Clorofórmio (Vetec, P.A.) e metanol (Nuclear, P.A.) foram usados para a purificação do PLLA. Para a preparação das

nanopartículas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente foi aplicado diclorometano (Fmaia, P.A.) como solvente orgânico. JVA foi sintetizado e gentilmente cedido pelo laboratório do Prof. Mauro V. de Almeida do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Acetonitrila (ACN, J.T. Baker, padrão HPLC), dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec, P.A.), fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Sigma-Aldrich, P.A.) e Água MilliQ (Millipore) foram usados para as análises de eficiência de encapsulação do JVA. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos, exceto o L-PLLA.

## 5.1.2 Preparação das Nanopartículas

### 5.1.2.1 Purificação do PLLA

A purificação do PLLA foi realizada de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 3 (item 3.1.2.1).

### 5.2.2.2 Polimerização em massa do MMA

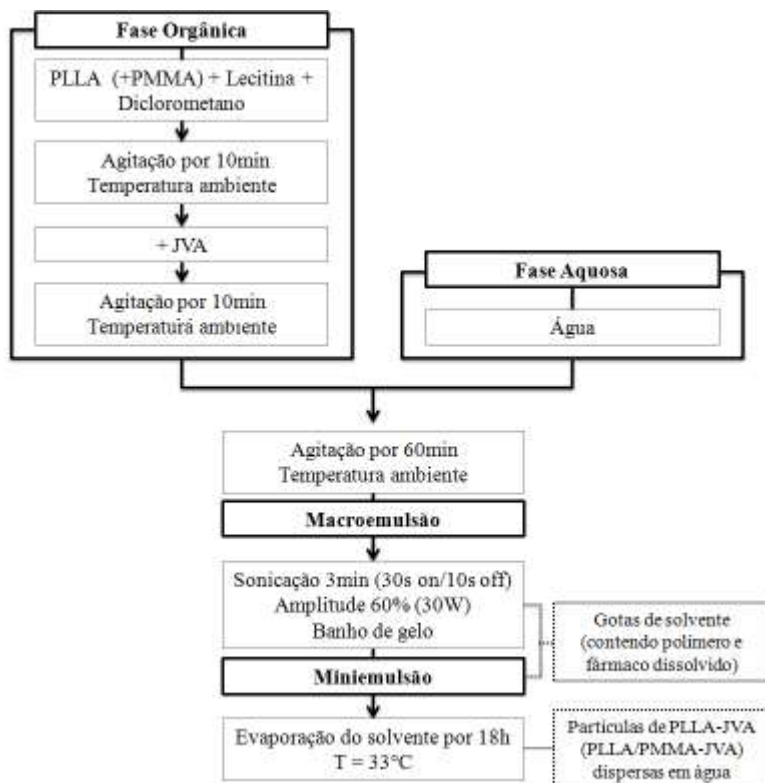
O processo de síntese do PMMA utilizado para preparação das nanopartículas blenda foi realizado segundo o procedimento descrito no Capítulo 4 (item 4.1.2.2).

### 5.2.2.3 Preparação das Nanopartículas de PLLA com JVA

Foram utilizadas duas estratégias para preparação das nanopartículas: (1) miniemulsificação/evaporação do solvente e (2) polimerização em miniemulsão. As nanopartículas de L-PLLA e H-PLLA foram obtidas através da estratégia (1), enquanto as nanopartículas blenda de PLLA/PMMA foram obtidas através de ambas as técnicas (1) e (2).

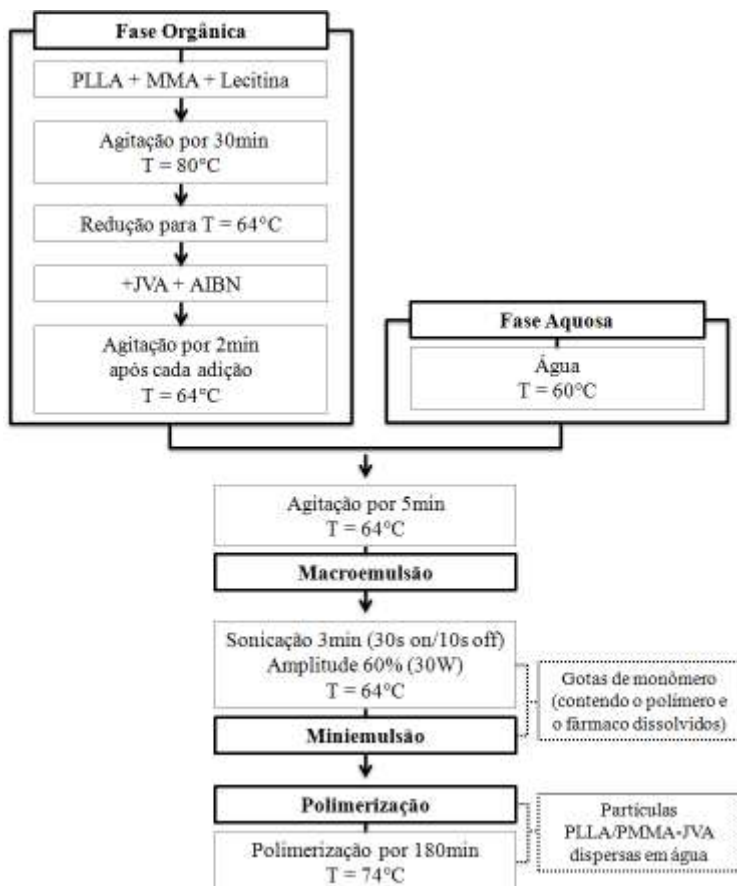
***Miniemulsificação/Evaporação do Solvente:*** As nanopartículas de PLLA foram preparadas de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 3 (item 3.1.2.2), e as nanopartículas blenda de PLLA/PMMA segundo a descrição do Capítulo 4 (subitem 4.1.2.3). O JVA foi adicionado à fase orgânica após a solubilização dos polímeros e lecitina em diclorometano. A solução foi então mantida por 10 minutos sob

agitação para solubilização do JVA. A Figura 5.1 apresenta o fluxograma do processo de preparação das miniemulsões através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente.



**Figura 5.1:** Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas de PLLA-JVA e blenda de PLLA/PMMA-JVA através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente.

**Polimerização em Miniemulsão:** As nanopartículas blenda preparadas por polimerização em miniemulsão seguiram o procedimento descrito no Capítulo 4 (subitem 4.1.2.3). O JVA foi adicionado à fase orgânica após a solubilização do PLLA e lecitina no monômero e antes da adição do iniciador (AIBN), e a solução foi mantida durante 2min sob agitação a 64°C. A Figura 5.2 apresenta o fluxograma do processo de preparação das miniemulsões via polimerização em miniemulsão.



**Figura 5.2:** Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA-JVA via polimerização em miniemulsão.

As formulações básicas utilizadas na preparação das nanopartículas de PLLA estão apresentadas na Tabela 5.1, e das nanopartículas blenda na Tabela 5.2 e 5.3.

**Tabela 5.1:** Formulações básicas das nanopartículas de PLLA-JVA preparadas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente.

PLLA	PLLA (g)	JVA <sup>a</sup> (g)	Lecitina (g)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (g)	H <sub>2</sub> O (g)
L-PLLA	0,3	-	0,072	10	24
L-PLLA	0,3	0,5% - 0,0015	0,072	10	24
L-PLLA	0,3	1,0% - 0,0030	0,072	10	24
L-PLLA	0,3	2,5% - 0,0075	0,072	10	24
L-PLLA	0,3	5,0% - 0,0150	0,072	10	24
L-PLLA	0,3	10% - 0,0300	0,072	10	24
L-PLLA	0,3	15% - 0,0450	0,072	10	24
H-PLLA	0,3	5,0% - 0,0150	0,072	10	24

<sup>a</sup> Porcentagem mássica em relação à massa de PLLA.

**Tabela 5.2:** Formulações básicas das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA-JVA preparadas via miniemulsificação/evaporação do solvente.

Razão PLLA/PMMA	L-PLLA (g)	PMMA (g)	JVA <sup>a</sup> (g)	Lecitina (g)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (g)	H <sub>2</sub> O (g)
10:1	0,273	0,027	0,0150	0,072	10	24
5:1	0,250	0,050	0,0150	0,072	10	24
2:1	0,200	0,100	0,0150	0,072	10	24
1:1	0,150	0,150	0,0150	0,072	10	24
1:5	0,050	0,250	0,0150	0,072	10	24
1:10	0,027	0,273	0,0150	0,072	10	24

<sup>a</sup> 5% (m/m) em relação ao PLLA.

**Tabela 5.3:** Formulações básicas das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA-JVA preparadas via reação de polimerização em miniemulsão.

Experimento	L-PLLA (g)	MMA (g)	Lecitina (g)	JVA <sup>b</sup> (g)	AIBN (g)	H <sub>2</sub> O (g)
PLLA/MMA-10% <sup>a</sup>	0,286	2,857	0,041	-	0,057	30
PLLA/MMA-10%-JVA <sup>a</sup>	0,286	2,857	0,042	0,157	0,057	30

<sup>a</sup> Percentual em relação à massa de MMA.

<sup>b</sup> 5% (m/m) em relação ao PLLA+MMA.

### 5.1.3 Caracterização das Nanopartículas

#### 5.1.3.1 Diâmetro médio (Dp) e Índice de Polidispersão (PDI)

O diâmetro médio (em intensidade) e o índice de polidispersão das nanopartículas foram determinados através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering – DLS) segundo procedimento descrito no Capítulo 3 (item 3.1.3.1). As amostras das nanopartículas preparadas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente foram analisadas sem prévia diluição. Aquelas preparadas via polimerização em miniemulsão foram diluídas na razão volumétrica de 1:3 em água saturada com MMA.

#### 5.1.3.2 Conversão monômero-polímero

A conversão do monômero em polímero ao longo do tempo das reações de polimerização foi determinada por análise gravimétrica e cromatografia gasosa, de acordo como descrito no Capítulo 4 (item 4.1.3.2 e 4.1.3.3, respectivamente). Contudo, são apresentadas apenas as curvas das cinéticas corrigidas obtidas por cromatografia gasosa. A correção das curvas deu-se de acordo como descrito no Capítulo 4, item 4.2.1.2.

#### 5.1.3.3 Eficiência de Encapsulação do JVA

As análises de eficiência de encapsulação do JVA foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em um equipamento da marca Waters, equipado com sistema de separação AllianceBIO e detector UV-VIS de rede fotodiodo SPD-M20A, alocado no Laboratório de Imunofarmacologia e Doenças Infecciosas (LIDI) da UFSC. Foi utilizada a coluna cromatográfica Luna 5uC18(2)100A (250nm x 4,6nm x 5µm) (Phenomenex). A fase móvel foi composta por uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 50mM pH = 3,5 com proporção 65:35 (v/v), utilizando fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 20µL e detecção por ultravioleta no comprimento de onda de 298nm. Os parâmetros utilizados no cromatógrafo para preparação da curva de calibração e para a análise das amostras estão resumidos na Tabela 5.4.

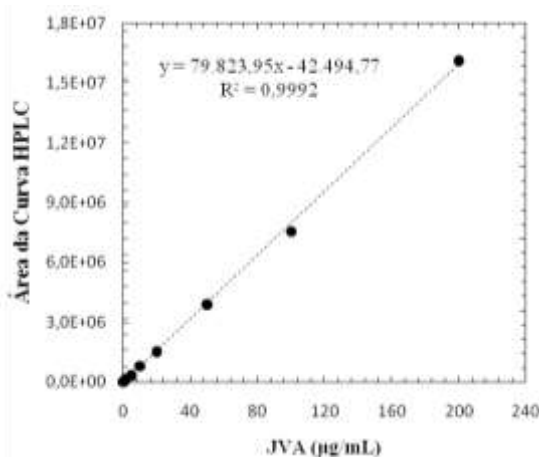


**Tabela 5.4:** Parâmetros do CLAE utilizados para determinação do JVA.

Parâmetros	Descrição
Coluna	Luna RP-C18, Phenomenex (250 mm x 4,6 mm)
Granulometria	5 µm
Fase móvel	Acetonitrila:tampão <sup>a</sup> (65:35, v/v)
Volume de injeção	20 µL
Fluxo	1,0 mL/min
Deteção	298nm
Temperatura de injeção	25°C
Tempo de retenção	4,7 minutos

<sup>a</sup> Tampão fosfato de potássio monobásico 50mM, pH = 3,5

A curva de calibração foi preparada com a diluição de uma solução estoque de JVA em acetonitrila (2 mg/mL) em fase móvel para obter soluções nas concentrações na faixa de 0,1 à 200µg/mL. Uma relação linear entre a concentração de JVA e a área do pico integrado dado como resposta no cromatógrafo foi encontrada. A curva de calibração para o JVA é apresentada na Figura 5.3

**Figura 5.3:** Curva de calibração do JVA.

A eficiência de encapsulação (%) foi determinada da seguinte forma: a concentração total de JVA presente em 1mL de miniemulsão (ST – suspensão total) foi determinada pela solubilização de 0,5mL de dispersão de nanopartículas em 1,0mL de DMSO e sonicada para

promover o rompimento das nanopartículas (UNIQUE, Desruptor de Células Ultra-Sônico, 50W) por 1 minuto com 50W de potência. Em seguida, 0,5mL dessa solução foi diluída com 0,5mL de fase móvel e a mistura obtida foi centrifugada durante 20min a 13.400 rpm (MiniSpin, Eppendorf). A amostra foi então analisada no cromatógrafo. A quantidade de JVA presente na fase aquosa da miniemulsão (JVA não encapsulado) foi determinada pela ultrafiltração de 500µL de dispersão de nanopartículas em Amicon Ultra-0.5 (Millipore, 100KDa – 100.000 NMWL) durante 30min a 13.400 rpm. O filtrado foi transferido para um vial e analisado no cromatógrafo. O JVA encapsulado nas nanopartículas foi calculado com aplicação dos dados na (Eq. 5.1).

$$EE(\%) = \frac{m_{Total} - m_{Livre}}{m_{Total}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5.1})$$

Onde:

- EE - Eficiência de Encapsulação do JVA (%);
- $m_{Total}$  - Massa de JVA determinado em 1mL de dispersão de nanopartículas (JVA total, µg)
- $m_{Livre}$  - Massa de JVA determinado em 1mL de fase aquosa (JVA livre, não encapsulado, µg)

#### 5.2.3.4 Cinética de liberação *in vitro* do JVA

Para a realização das análises de liberação do JVA *in vitro* foi utilizado um Banho Dubinhoff (shaker) com temperatura controlada a 37°C, onde foram imersos erlenmeyers de vidro devidamente tampados contendo a solução de nanopartículas. Para garantir a condição *sink* (condição em que a concentração do fármaco no meio durante todo o teste de dissolução está em 20% da concentração de saturação deste fármaco no meio de liberação), foram dispersos 0,8mL de miniemulsão de nanopartículas em 49,2mL de tampão fosfato salino (PBS) 0,05mM, pH = 7,4. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, alíquotas de 500µL foram retiradas e ultrafiltradas em Amicon Ultra-0.5 (Millipore, 100KDa – 100.000 NMWL) durante 30min a 13.400 rpm. Após a coleta, o volume removido foi repostado com tampão fosfato para manutenção das condições *sink*. O sobrenadante foi diluído na proporção de 1:1 em fase móvel (ACN:tampão 65:35 (v/v)) e analisado via CLAE (utilizando as condições analíticas descritas para

determinação da eficiência de encapsulação). As concentrações obtidas foram convertidas em porcentagem de fármaco liberado e utilizadas para elaboração de curvas do perfil de liberação do JVA das nanopartículas.

#### 5.1.3.5 Temperaturas de Transição Vítrea (T<sub>g</sub>), Cristalização (T<sub>c</sub>) e Fusão Cristalina (T<sub>m</sub>)

As temperaturas de transição vítrea (T<sub>g</sub>), cristalização (T<sub>c</sub>) e fusão cristalina (T<sub>m</sub>) das amostras liofilizadas foram determinadas utilizando-se um equipamento de Calorimetria Diferencial de Varredura (Differential Scanning Calorimetry – DSC). As condições das análises seguiram o procedimento descrito no Capítulo 3 (item 3.1.3.3).

### 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

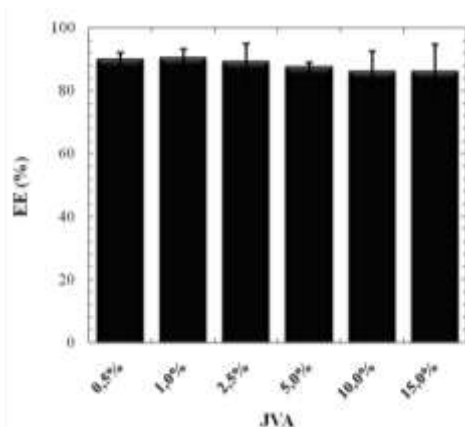
Diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais se destacam as características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, as características da superfície da partícula ou a natureza do polímero, a quantidade de fármaco adicionada à formulação, a ordem de adição do fármaco (incorporação ou incubação) e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

#### 5.2.1 Efeito da concentração de JVA sobre a eficiência de encapsulação

O efeito da quantidade de fármaco adicionada à formulação das nanopartículas poliméricas de PLLA sobre a eficiência de encapsulação, diâmetro médio (D<sub>p</sub>) e índice de polidispersão (PDI) foram avaliados. Os experimentos foram realizados em triplicata utilizando 0,3 g de L-PLLA (M<sub>w</sub> = 13.700 g/mol), 0,072g de lecitina, 10g de diclorometano e 24g de água destilada. Os resultados obtidos para o tamanho médio das nanopartículas (valor médio das medidas) e desvio padrão estão apresentados na Tabela 5.5 e Figura 5.4.

**Tabela 5.5:** Efeito da concentração de JVA no Dp e PDI médios das nanopartículas de L-PLLA.

JVA (g)	Partículas de PLLA-JVA			
	Dp (nm)	Desvio Padrão	PDI	Desvio Padrão
-	178,6	4,9	0,126	0,012
0,5%	178,7	2,5	0,116	0,024
1,0%	179,3	3,2	0,123	0,016
2,5%	184,7	6,8	0,117	0,008
5,0%	190,3	3,5	0,116	0,011
10,0%	196,7	5,9	0,151	0,020
15,0%	203,3	10,3	0,171	0,005



**Figura 5.4:** Efeito da concentração de JVA na eficiência de encapsulação em nanopartículas de L-PLLA obtidas por miniemulsificação/evaporação do solvente.

Os resultados apresentados na Tabela 5.5 e Figura 5.4 mostram que a adição de JVA teve influência sobre o diâmetro médio final das nanopartículas, que sofreram um pequeno aumento com o aumento da concentração de JVA. Por outro lado, o PDI não foi afetado de forma acentuada, exceto quando utilizado JVA nas concentrações de 10 e 15%, quando é possível observar um alargamento da distribuição de tamanho. Nestas concentrações houve a formação de precipitado durante a evaporação do solvente orgânico, indicando que as miniemulsões perdem parcialmente a estabilidade com a adição de elevadas

quantidades de JVA. Todavia, todas as concentrações estudadas alcançaram eficiência média de encapsulação superior a 85%.

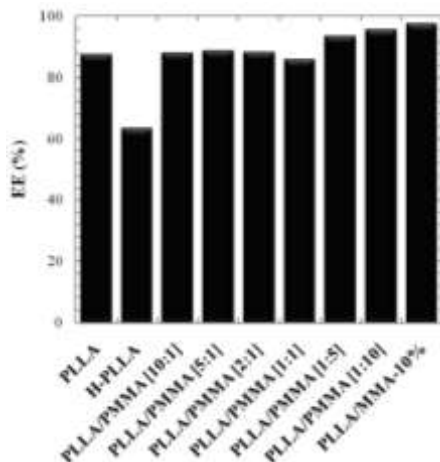
Diante dos resultados, foi escolhida a concentração de 5% (em relação à massa de PLLA) de JVA para dar continuidade aos experimentos.

### 5.2.2 Eficiência de encapsulação do JVA em diferentes condições experimentais

Foi avaliada a eficiência de encapsulação do JVA em nanopartículas de PLLA de baixa e alta massa molar (L-PLLA e H-PLLA, respectivamente), e em nanopartículas blenda de PLLA/PMMA obtidas por miniemulsificação/evaporação do solvente (mini/evap) e polimerização em miniemulsão (polim/mini). A influência da proporção de PMMA nas blends também foi avaliada, bem como o método de preparação das nanopartículas. Os resultados de diâmetro médio ( $D_p$ ) e índices de polidispersão (PDI) obtidos para as nanopartículas branco (sem JVA) e com JVA dos experimentos das Tabela 5.2 e 5.3 estão apresentados na Tabela 5.6, e na Figura 5.5 as eficiências de encapsulação. Em todos os experimentos foi utilizado o JVA na concentração de 5% (m/m) em relação ao PLLA, PLLA+PMMA ou PLLA+MMA.

**Tabela 5.6:** Diâmetro médio e PDI das nanopartículas de PLLA e PLLA/PMMA contendo 5% (m/m) de JVA.

Experimento	Método	Partículas Branco		Partículas com JVA	
		$D_p$ (nm)	PDI	$D_p$ (nm)	PDI
L-PLLA	Mini/evap	176	0,104	189	0,111
H-PLLA	Mini/evap	213	0,119	218	0,122
PLLA/PMMA [10:1]	Mini/evap	175	0,081	195	0,168
PLLA/PMMA [5:1]	Mini/evap	177	0,114	197	0,135
PLLA/PMMA [2:1]	Mini/evap	190	0,115	197	0,133
PLLA/PMMA [1:1]	Mini/evap	199	0,121	231	0,155
PLLA/PMMA [1:5]	Mini/evap	263	0,122	230	0,183
PLLA/PMMA [1:10]	Mini/evap	200	0,139	221	0,197
PLLA/MMA-10%	Polim/mini	114	0,343	130	0,317



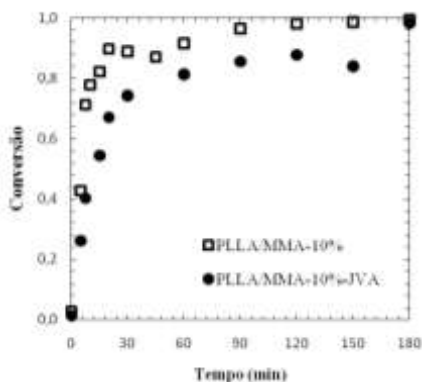
**Figura 5.5:** Eficiência de encapsulação do JVA em nanopartículas de PLLA e nanopartículas blenda de PLLA/PMMA.

A partir dos resultados obtidos é possível observar que houve um aumento no diâmetro médio e alargamento da distribuição de tamanho das nanopartículas devido à adição de JVA. Esse aumento foi ligeiramente mais acentuado para as nanopartículas blenda. Com exceção do PLLA de alta massa molar, em todos os casos a eficiência de encapsulação alcançada ficou acima de 80%. As nanopartículas blenda com uma maior concentração de PMMA apresentaram maior eficiência de encapsulação que as nanopartículas de PLLA puro e com proporção mássica de PLLA/PMMA de até [1:1].

A maior eficiência, aproximadamente 97% de encapsulação, foi obtida para as nanopartículas blenda obtidas por polimerização em miniemulsão. A polimerização em miniemulsão inicia-se nas gotas de monômero que contém JVA e PLLA. Como não há transporte de massa envolvido para fora das partículas, o JVA permanece dentro destas. Leimann (2011) obteve resultados semelhantes quando encapsulou progesterona em nanopartículas de PHBV e PHBV/PS via miniemulsificação/evaporação do solvente e polimerização em miniemulsão, respectivamente, e a menor eficiência de encapsulação obtida via miniemulsificação foi atribuída ao arraste de uma fração de fármaco para fora das nanopartículas juntamente com o solvente orgânico durante o processo de transferência deste para fase aquosa.

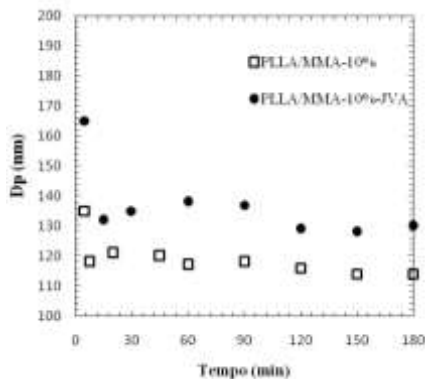
### 5.2.3 Cinética das polymerizações em miniemulsão para encapsulação do JVA

O objetivo desta análise foi verificar a possibilidade do JVA exercer alguma influência sobre a cinética de polymerização durante a obtenção das nanopartículas blenda de PLLA e MMA via polymerização em miniemulsão. Os resultados obtidos até 180min das reações com e sem JVA para o diâmetro médio ( $D_p$ ) e índice de polidispersão (PDI) estão apresentados na Tabela 5.6 do item 5.2.2. O efeito da adição do JVA nas cinéticas corrigidas de polymerização do metacrilato de metila em miniemulsão pode ser visualizado na Figura 5.6, e na Figura 5.7 a evolução do diâmetro médio das nanopartículas durante as reações.



**Figura 5.6:** Efeito da adição do JVA nas cinéticas de polymerização do MMA via polymerização em miniemulsão (cinéticas corrigidas determinadas por cromatografia gasosa).

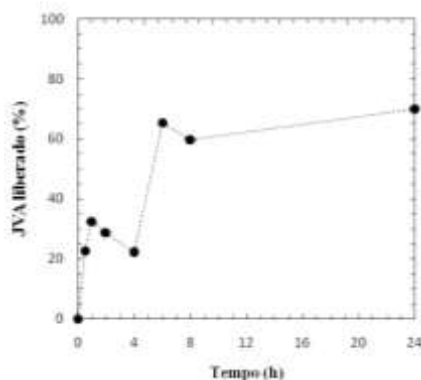
As cinéticas de polymerização foram afetadas pela adição do JVA, bem como a evolução do tamanho médio de partícula. O experimento PLLA/MMA-10%-JVA apresentou uma cinética mais lenta comparado ao mesmo experimento sem JVA. Este comportamento pode estar relacionado a uma interação das moléculas de JVA com os radicais de iniciador gerados e/ou radicais poliméricos. Em relação ao diâmetro médio, a reação de polymerização com JVA resultou em partículas ligeiramente maiores.



**Figura 5.7:** Efeito da adição de JVA no diâmetro médio das nanopartículas blenda durante as reações de polimerização em miniemulsão.

#### 5.2.4 Estudos preliminares da liberação *in vitro* do JVA

O estudo preliminar de liberação do JVA a partir de nanopartículas de L-PLLA em meio tamponado, pH = 7,4 foi conduzido com a retirada de alíquotas nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas. Os resultados estão apresentados na Figura 5.8.



**Figura 5.8:** Cinética de liberação do JVA a partir de nanopartículas de L-PLLA (5% de JVA em relação à massa de PLLA).

Os resultados revelam que a liberação do JVA das nanopartículas de L-PLLA preparadas por miniemulsificação/evaporação do solvente



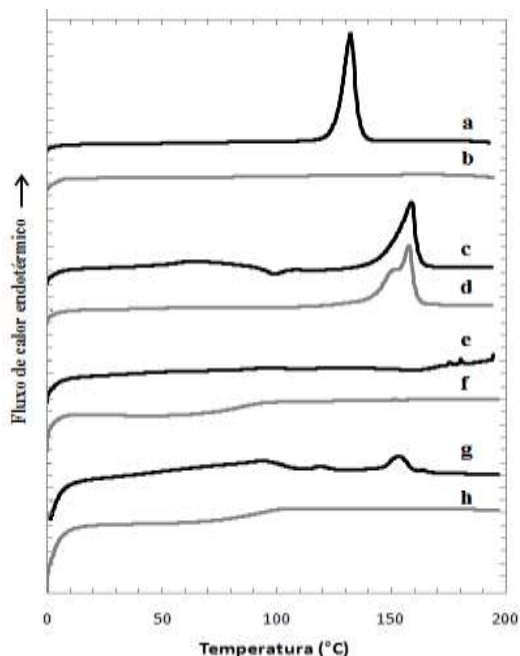
foi rápida, com aproximadamente 30% de JVA liberado em 1 hora e 70% após 24 horas.

Neste teste preliminar de liberação *in vitro*, a rápida liberação inicial, que caracteriza o “efeito burst”, parece indicar que uma fração do fármaco encontra-se adsorvida à superfície da partícula. Após este período a taxa de liberação, que se apresenta de forma mais sustentada e lenta, é controlada pelo processo de difusão do fármaco, intumescimento ou erosão do polímero, ou ainda, a combinação de ambos os processos (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

### 5.2.5 Caracterização das nanopartículas por DSC

As análises de DSC foram realizadas com o objetivo de avaliar a possibilidade de interações entre fármaco e polímero, bem como o comportamento térmico das nanopartículas polimérica após a adição do JVA. A determinação dessas características é importante não apenas por permitir o conhecimento da cristalinidade e das possíveis interações entre o fármaco e polímero, mas também devido à influência das mesmas na liberação *in vitro* e *in vivo* do fármaco (VERGER *et al.*, 1998; SOARES, 2009).

A Figura 5.9 apresenta os termogramas do primeiro e segundo aquecimento para o JVA (a, b), para as nanopartículas contendo JVA de L-PLLA (b, c) e PLLA/PMMA obtidas via miniemulsificação/evaporação do solvente (d, e) e polimerização em miniemulsão (f, g). Todas as miniemulsões continham 5% (m/m) de JVA e as nanopartículas blenda foram preparadas com proporção mássica de PLLA/PMMA e PLLA/MMA igual a 1:5 e 1:10, respectivamente. As análises de DSC das nanopartículas branco de L-PLLA e PLLA/PMMA (sem JVA) estão apresentadas nas Figura 3.7 e Figura 4.13, respectivamente. Os detalhes da T<sub>g</sub>, T<sub>c</sub>, T<sub>m</sub>, Entalpias de cristalização ( $\Delta H_c$ ) e fusão ( $\Delta H_m$ ) e grau de cristalinidade ( $\chi_c$ ) das nanopartículas com e sem JVA estão resumidos na Tabela 5.7.



**Figura 5.9:** Curvas de DSC do primeiro e segundo aquecimento para o JVA (a, b, respectivamente); Nanopartículas de L-PLLA-JVA (c, d, respectivamente); Nanopartículas blenda de PLLA/PMMA-JVA obtidas via miniemulsificação/evaporação do solvente (1:5) (e, f, respectivamente) e polimerização em miniemulsão (1:10) (g, h, respectivamente).

No termograma do primeiro aquecimento, a amostra de JVA livre apresenta um pico endotérmico em 133,4°C ( $\Delta H_m = 91,39 \text{ J/g}$ ) referente à fusão dos cristais do fármaco. Este evento não se repete durante o segundo aquecimento, indicando que as moléculas de JVA não voltam a se organizar em estruturas cristalinas após o aquecimento. Diante desse resultado, para se obter informações acerca da cristalinidade do JVA após o preparo das miniemulsões, é necessário analisar, principalmente, as curvas do primeiro aquecimento para as nanopartículas poliméricas.

Não é possível observar nos termogramas das nanopartículas de L-PLLA e PLLA/PMMA obtidas por miniemulsificação/evaporação do solvente qualquer evento térmico endotérmico referente à presença de cristais de JVA. Em contrapartida, no termograma do primeiro aquecimento das nanopartículas blenda obtidas por polimerização em miniemulsão, pode-se observar picos endotérmicos em 117,6°C e

151,6°C, possivelmente referentes à fusão cristalina do JVA e do L-PLLA, respectivamente. Este deslocamento em relação à curva de DSC do JVA e do L-PLLA pode ser um indicativo de interação físico-química entre o fármaco e a matriz polimérica.

**Tabela 5.7:** Temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), cristalização ( $T_c$ ) e fusão cristalina ( $T_m$ ) e Entalpias de cristalização ( $\Delta H_c$ ) e fusão cristalina ( $\Delta H_m$ ) do JVA e de nanopartículas (NP) de PLLA e PLLA/PMMA.

Polímero	Aquecimento	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$\Delta H_m$ (J/g)	$\chi_c$ (%)
JVA	1°	-	-	133	-	91,4	-
	2°	-	-	-	-	-	-
NP-PLLA (branco)	1°	56	100	160	-3,3	46,7	49,8
	2°	50	-	155	-	50,7	53,1
NP-PLLA-JVA	1°	55	99	158	3,0	44,6	47,6
	2°	44	-	157	-	46,2	49,3
PLLA/PMMA branco (mini/evap)	1°	-	-	-	-	-	-
	2°	87	-	-	-	-	-
PLLA/PMMA- JVA (mini/evap)	1°	-	-	-	-	-	-
	2°	81	-	-	-	-	-
PLLA/PMMA branco (poli/mini)	1°	-	-	-	-	-	-
	2°	49 104	-	-	-	-	-
PLLA/PMMA- JVA (poli/mini)	1°	-	-	117 151	-	-	-
	2°	88	-	-	-	-	-

Em relação às nanopartículas branco, a adição de JVA não afetou de forma acentuada as propriedades cristalinas do L-PLLA. Por outro lado, a presença do JVA afetou a miscibilidade das blendas. Aquelas produzidas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente tiveram a sua  $T_g$  reduzida de 89°C para 81°C. Já aquelas preparadas por polimerização em miniemulsão, ao contrário das nanopartículas de PLLA/PMMA branco, apresentaram uma única  $T_g$  em 88°C, indicando a formação de uma blenda miscível. Este fenômeno é decorrente, possivelmente, de uma interação físico-química do fármaco com o polímero.

### 5.3 CONCLUSÕES

Foram obtidas nanopartículas de PLLA e PLLA/PMMA contendo JVA através de duas técnicas diferentes: miniemulsificação/evaporação do solvente e polimerização em miniemulsão. A eficiência de encapsulação do JVA em nanopartículas de L-PLLA foi superior a 85% em todas as concentrações de JVA avaliadas. A adição do fármaco ocasionou o aumento do diâmetro médio das nanopartículas, principalmente quando o JVA foi aplicado nas concentrações de 10 e 15% (m/m) em relação à massa de polímero, indicando que as miniemulsões perdem parcialmente a estabilidade com a adição de elevadas quantidades de fármaco. De maneira geral, as nanopartículas blenda com uma maior concentração de PMMA apresentaram maior eficiência de encapsulação que as nanopartículas de PLLA puro e com proporção mássica de PLLA/PMMA inferior à [1:1], sendo a maior eficiência obtida para as nanopartículas preparadas por polimerização em miniemulsão. A cinética de polimerização em miniemulsão apresentou-se mais lenta na presença de JVA, apontando para uma possível interação das moléculas do fármaco com os radicais do iniciador e/ou radicais poliméricos. O teste preliminar de liberação *in vitro* do JVA a partir de nanopartículas de L-PLLA foi caracterizado por uma rápida liberação inicial, com aproximadamente 30% de JVA liberado durante a primeira hora e alcançando, ao fim de 24 horas, 70% de liberação. As análises de DSC revelaram a perda total da cristalinidade do fármaco durante o processo de preparo das nanopartículas via miniemulsificação/evaporação do solvente, e parcial via polimerização em miniemulsão. A adição de JVA levou à formação de uma blenda miscível a partir de reações de polimerização em miniemulsão, e a uma redução da temperatura de transição vítrea da blenda obtida por miniemulsificação/evaporação do solvente (em relação às nanopartículas branco), indicando algum tipo de interação físico-química entre o fármaco e a matriz polimérica.

## CAPÍTULO VI

### 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram preparadas partículas estáveis de tamanho submicrométrico de PLLA, PLLA/PMMA e PLLA/PS a partir de três diferentes técnicas: miniemulsificação/evaporação do solvente, polimerização em miniemulsão e polimerização em emulsão semeada.

Nanopartículas de PLLA foram obtidas utilizando a técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. Foram obtidas miniemulsões estáveis independentemente do tipo de surfactante e solvente orgânico utilizados, com exceção da lecitina e PVP-40 em clorofórmio. O aumento da concentração e massa molar de PLLA levou ao aumento do diâmetro médio das nanopartículas, além do alargamento da distribuição de tamanhos. A razão mássica entre a fase orgânica e aquosa também mostrou influência sobre o tamanho médio das nanopartículas, que diminuiu com o aumento da concentração de fase aquosa. Os efeitos sobre o tamanho de partícula estão associados à viscosidade da macroemulsão, à eficiência de estabilização dos surfactantes e à tensão interfacial dos solventes orgânicos com água. O processo de obtenção das nanopartículas proporcionou maior mobilidade das cadeias poliméricas devido à perda parcial da cristalinidade do polímero.

Foram preparadas nanopartículas blenda de PLLA/PMMA e PLLA/PS via técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente, e utilizando duas técnicas de polimerização diferentes, miniemulsão e emulsão semeada.

A concentração mássica de PMMA na blenda obtida pela miniemulsificação dos polímeros pré-formados afetou o diâmetro médio das nanopartículas blenda devido ao efeito da viscosidade da fase orgânica. As análises da morfologia das partículas e das propriedades térmicas revelaram a formação de uma blenda miscível e a perda de cristalinidade do PLLA durante a preparação da miniemulsão.

Na preparação das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA e PLLA/PS via polimerização em miniemulsão, a cinética de polimerização do estireno e metacrilato de metila não foi afetada pela presença de PLLA nas concentrações avaliadas. As conversões determinadas por gravimetria e cromatografia gasosa mostraram que houve perda de monômero por evaporação e polimerização prematura

durante o preparo da miniemulsão devido à elevada temperatura utilizada durante esta etapa. As microscopias das nanopartículas blenda aliadas às curvas de DSC indicam a obtenção de uma blenda imiscível, com morfologia do tipo núcleo-casca, possivelmente com um núcleo rico em polímero sintético (PMMA ou PS) recoberto por uma fina casca rica em PLLA.

A técnica de polimerização em emulsão semeada não se mostrou tão eficiente na preparação das nanopartículas blenda de PLLA/PMMA quanto as técnicas de miniemulsificação/evaporação do solvente e polimerização em miniemulsão. O alargamento da distribuição de tamanho e a diminuição do diâmetro médio das nanopartículas em relação aos valores iniciais das sementes de PLLA, bem como as imagens de MET, indicaram que houve a formação de novas partículas de PMMA através da nucleação homogênea e/ou micelar em todos os experimentos realizados, principalmente naqueles em que foi utilizado um iniciador de caráter hidrofílico (KPS).

Foi possível utilizar até 5% (m/m, em relação à massa de PLLA) de JVA na preparação das nanopartículas de PLLA sem que ocorresse a desestabilização das miniemulsões. A adição de elevadas quantidades de JVA à formulação (10 e 15% de JVA) ocasionou a precipitação das nanopartículas devido à perda parcial da estabilidade das miniemulsões. Contudo, a eficiência de encapsulação foi superior a 85% em todas as concentrações avaliadas. As nanopartículas blenda com maior concentração de PMMA foram mais eficazes na encapsulação do JVA em relação às nanopartículas de PLLA puro ou com razão mássica de PLLA/PMMA inferior a [1:1]. A presença de JVA nas reações de polimerização em miniemulsão resultou em uma polimerização mais lenta do MMA, indicando uma possível interação físico-química entre o fármaco e os radicais de iniciador. O teste preliminar de liberação *in vitro* do JVA em solução tampão (pH = 7,4) a partir de nanopartículas de PLLA revelam um *burst* inicial de liberação, com aproximadamente 30% do JVA liberado na primeira hora. As análises de DSC apontam para a perda total da cristalinidade do fármaco durante o processo de preparação das nanopartículas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente, e parcial via polimerização em miniemulsão. Dessa forma, as técnicas de miniemulsificação/evaporação do solvente e polimerização em miniemulsão apresentaram-se eficientes e versáteis na preparação de nanopartículas poliméricas biocompatíveis contendo um fármaco hidrofóbico.

## 6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros destacam-se as seguintes questões:

- Determinar a concentração residual de solvente orgânico nas nanopartículas preparadas por miniemulsificação/evaporação do solvente;
- Estudar a tensão interfacial entre os polímeros componentes das nanopartículas blenda;
- Verificar a miscibilidade das blends de PLLA/PMMA obtidas por polimerização em emulsão semeada e PLLA/PS via polimerização em miniemulsão;
- Estudar a degradação das nanopartículas por hidrólise;
- Estudar a possibilidade do processo de obtenção de nanopartículas híbridas de PLLA com outros polímeros;
- Preparar nanopartículas blenda de PLLA com outros polímeros naturais como o PHBV e PCL;
- Verificar a ocorrência de enxertia do PLLA nas nanopartículas blenda obtidas via polimerização em miniemulsão e emulsão semeada;
- Estudar a liberação *in vitro* e *in vivo* das nanopartículas de PLLA e blends de PLLA/PMMA e PLLA/PS contendo JVA;
- Avaliar a encapsulação do JVA a partir de outras técnicas de preparação de nanopartículas;
- Avaliar o tipo de interação físico-química entre o fármaco e a matriz polimérica;
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas de PLLA e blends;
- Estudar a estabilidade das miniemulsões e de nanopartículas liofilizadas contendo JVA.





## CAPÍTULO VII

### 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, Theresa M.; CULLIS, Pieter R.. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. **Science**, v. 303, p. 1818-1821. Mar. 2004.

ALONSO, María J.; LOSA, Cándida; CALVO, Pilar; VILA-JATO, José. Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 68, p. 69-75. Feb. 1991.

ANDRADE, Carolina H.; PASQUALOTO, Kerly F. M.; ZAIM, Márcio H.; FERREIRA, Elizabeth I.. Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: inibidores da InhA, enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n.2, p. 167-179. Abr./Jun. 2008.

ANISIMOVA, Y.V.; GELPERINA, S.I.; PELOQUIN, C.A.; HEIFETS, L.B.. Nanoparticles as antituberculosis drugs carriers: effect on activity against *Mycobacterium tuberculosis* in human monocyte-derived macrophages. **Journal Of Nanoparticle Research**, v. 2, n. 2, p. 165-171. June 2000.

ASUA, José M.. Miniemulsion polymerization. **Progress In Polymer Science**, V. 27, p. 1283-1346. Feb. 2002.

AURAS, Rafael A.; HARTE, Bruce; SELKE, Susan; HERNANDEZ, Ruben. Mechanical, Physical, and Barrier Properties of Poly(Lactide) Films. **Journal Of Plastic Film And Sheeting**, V.19, p. 123-135. Apr. 2003.

AZEVEDO, Marcelo M. M. de. **Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas**. 153 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

AZEVEDO, Marcelo M. M. de. **Nanoesferas e Liberação Controlada de Fármacos**. 20 f. Revisão Bibliográfica do LQES – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

BERNARDY, Neusa. **Estudo Cinético da Polimerização em Miniemulsão Visando a Nanoencapsulação da Quercetina**. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

BILATI, Ugo; ALLÉMANN, Eric; DOELKER, Eric. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 67-75. Jan. 2005.

BOUISSOU, Camille; WALLE, Chris V. D.. Poly(lactico -glycolic acid) Microspheres. In: UCHEGBU, Ijeoma F.; SCHATZLEIN, Andreas G.. **Polymers in Drug Delivery**. United States Of America: CRC Press, 2006. p. 81-99.

CHERN, C. S.. Emulsion polymerization mechanisms and kinetics. **Progress In Polymer Science**, v. 31, p. 443-486. May 2006.

CHORNY, Michael; FISHBEIN, Ilia; DANENBERG, Haim; GOLOMB, Gershon. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. **Journal Of Controlled Release**, v. 83, p. 389-400. Oct. 2002.

DAS, Nandita G.; DAS, Sudip K.. Controlled-Release of Oral Dosage Forms. **Formulation, Fill & Finish**, p.10-16, 2003.

DE VECCHI, Rodrigo. **Avaliação da atividade antimicrobacteriana de nanopartículas contendo um análogo da isoniazida**. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DONG, Yuancai; FENG, Si-shen. Nanoparticles of poly(D,L-lactide)/methoxy poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) blends for controlled release of paclitaxel. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, v. 78, p. 12-19. 2006.

FARIA, Tatiany J. de; ROMAN, Mariane; SOUZA, Nicole M. de; De VECCHI, Rodrigo; ASSIS, João Vitor de; SANTOS, Ana Lúcia Gomes dos; BECHTOLD, Ivan H.; WINTER, Nathalie; SOARES, Maurílio José; SILVA, Luciano Paulino; DE ALMEIDA, Mauro V.; BÀFICA, André. An isoniazid analogue promotes nanoparticle-*Mycobacterium 2* tuberculosis interactions and enhances bacterial killing by macrophages. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. Versão online, DOI 10.1128/AAC.05993-11. 2012.

FERREIRA, B. M. P.; ZAVAGLIA, A. C.; DUEK, E. A. R.. Films of Poly (L - Lactic Acid)/Poly(Hydroxybutyrate-co-Hydroxyvalerate) Blends: In vitro Degradation. **Materials Research**, v. 4, n.1, p.34-42. Jan. 2001.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S.. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4. Oct. 1989.

FISPQ CLOROFÓRMIO, No SV-010, Disponível em: <<http://www.fmaia.com.br/SV%20010.doc>>. Acesso em 12 jan. 2012(a).

FISPQ DICLOROMETANO, No SV-011, Disponível em: <<HTTP://www.fmaia.com.br/SV%20011.doc>>. Acesso em 12 jan. 2012(b).

FISPQ METACRILATO DE METILA, Disponível em: <<HTTP://www.vettaquimica.com.br/wp-content/uploads/2010/06/MMA-METIL-METACRILATO.pdf>>. Acesso em 09 fev. 2012(c).

FREITAS, M.N.; MARCHETTI, J.M.. Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 295, p. 201-211. May 2005.

FREITAS, Sergio; MERKLE, Hans P.; GANDER, Bruno. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal Of Controlled Release**, v. 102, p. 313-332. Mar. 2005.

GARLOTTA, Donald. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). **Journal Of Polymers And The Environment**, v. 2, p. 63-84. Apr. 2001.

GASPAR, M. M; BLANCO, D; CRUZ, M. E; ALONSO, M. J. Formulation of L-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release. *Journal of Controlled Release*, v. 52, p. 53-62. Mar. 1998.

GELPERINA, Svetlana; KISICH, Kevin; ISEMAN, Michael D.; HEIFETS, Leonid. The Potential Advantages of Nanoparticle Drug Delivery Systems in Chemotherapy of Tuberculosis. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, v. 172, p.1487-1490. 2005.

GUPTA, Ram B.; KOMPELLA, Uday B. (Ed.). **Nanoparticle Technology for Drug Delivery** [Drugs and the Pharmaceutical Sciences]. New York: Taylor & Francis, 2006.

GUYOT, Alain; LANDFESTER, Katharina; SCHORK, F. Joseph, WANG, Chunpeng. Hybrid polymer latexes. **Progress In Polymer Science**, v. 32, p. 1439-1461, Dec. 2007.

HAMAD, Kotiba; KASEEM, Mosab; DERI, Fawaz. Rheological and mechanical properties of poly(lactic acid)/polystyrene polymer blend. **Polymer Bulletin**, v. 65, p. 509-519. Set. 2010.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M.. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, p. 319-327, Aug. 2002.

HATEFI, A.; AMSDEN, B.. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. **Journal Of Controlled Release**, v. 80, p. 9-28. Apr. 2002.

HIREMATH, Praveen S.; SAHA, Ranendra N.. Controlled Release Hydrophilic Matrix Tablet Formulations of Isoniazid: Design and In Vitro Studies. **AAPS Pharmscitech**, Vol. 9, n.4, p.1171-1178, Dec. 2008.

HOFFMAN, Allan S.. Selecting the Right Polymer for Biomaterial Applications. In: UCHEGBU, Ijeoma F.; SCHATZLEIN, Andreas G. (Comp.). **Polymers in Drug Delivery**. United States Of America: CRC Press, 2006. p. 7-21.

JAHNO, Vanusca D.. **Síntese e caracterização do poli (L-ácido láctico) para uso como biomaterial**. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

JEON, Hyun-Jeong; JEONG, Young-Il; JANG, Mi-Kyeong; PARK, Young-Hoon; NAH, Jae-Woon. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 207, p. 99-108. Oct. 2000.

KWON, Hye-young; LEE, Jun-young; CHOI, Sung-wook; JANG, Yangsoo; KIM, Jung-Hyun. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects**, v. 182, p. 123-130. June 2001.

La CAL, José C. de; LEIZA, José R.; ASUA, José M.; BUTTÈ, Alessandro; STORTI, Giuseppe; MORBIDELL, Massimo. Emulsion Polymerization. In: MEYER, Thierry; KEURENTJES, Jos, **Handbook of Polymer Reaction Engineering**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. p. 248-322.

LASSALLE, Verónica; FERREIRA, María L.. PLA Nano- and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, p. 767-783. June 2007.

LEGRAND, Philippe; LESIEUR, Sylviane; BOCHOT, Amélie; GREF, Ruxandra; RAATJES, Wouter; BARRATT, Gillian; VAUTHIER, Christine. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 344, p. 33-43. Nov. 2007.

LEIMANN, Fernanda V. **Nanopartículas Híbridas de Polímero Natural (PHBV)/Polímero Sintético**. 133 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

LEUNG, Bonnie O.; HITCHCOCK, Adam P.; BRASH, John L.; SCHOLL, Andreas; DORAN, Andrew. Phase Segregation in Polystyrene-Polylactide Blends. **Macromolecules**, v. 42, p. 1679-1684. Mar. 2009.

LI, Xiaoling; JASTI, Bhaskara R. (Ed.). **Design of Controlled Release Drug Delivery Systems**. United States: Mcgraw-hill, 2005.

LU, Xinya; WEISS, R.A.. Relationship between the glass transition temperature and the interaction parameter of miscible binary polymer blends. **Macromolecules**, v. 25, p. 3242-3246. June 1992.

LUNT, James. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. **Polymer Degradation And Stability**, v.59, p. 145-152. Jan. 1998.

MAINARDES, Rubiana M.; EVANGELISTA, Raul C.. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 290, p. 137-144. Feb. 2005.

MALINOVA, Violeta; MEIER, Wolfgang. Polymer Materials for Biomedical Applications. In: BROZ, Pavel. **Polymer-based Nanostructu: Medical Applicationsres**. Cambridge: Rsc - Royal Society Of Chemistry, 2010. p. 3-15.

MITTAL, G.; SAHANA, D. K.; BHARDWAJ, V.; RAVI KUMAR, M. N. V.. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. **Journal Of Controlled Release**, v.119, p. 77-85. May 2007.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A.. Polymer based nanocapsules for drug delivery. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142. Jan. 2010.

MS – Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Sanitária**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 7 ed, Caderno 7, Ministério da Saúde, 2009.

MUSYANOVYCH, Anna; SCHMITZ-WIENKE, Julia; MAILÄNDER, Volker; WALTHER, Paul; LANDFESTER, Katharina. Preparation of Biodegradable Polymer Nanoparticles by Miniemulsion Technique and Their Cell Interactions. **Macromolecular Bioscience**, V. 8, p. 127-139. Feb. 2008.

NAMPOOTHIRI, K. Madhavan; NAIR, Nimisha R.; JOHN, Rojan P.. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8493-8501. Nov. 2010.

PARK, Jae Hyung; YE, Mingli; PARK, Kinam. Biodegradable Polymers for Microencapsulation of Drugs. **Molecules**, v. 10, p. 146-161. Jan. 2005.

PAULA, Josiane P. de. **Desenvolvimento de nanopartículas de poli(ácido láctico) para a administração oral de heparina**. 133 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PELTONEN, Leena; AITTA, Johanna; HYVÖNEN, Samuli; KARJALAINEN, Milja; HIRVONEN, Jouni. Improved Entrapment Efficiency of Hydrophilic Drug Substance During Nanoprecipitation of Poly(l)lactide Nanoparticles. **AAPS Pharmaceutical Science Technology**, v. 5, p. 1-6. Feb. 2004.

PEZZINI, Bianca Ramos; SILVA, Marcos Antônio Segatto; FERRAZ, Humberto Gomes. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 491-502. Out./Dez. 2007.

PINTO, J. C.; RAY, W. H. The dynamic behavior of continuous solution polymerization reactors – VII. Experimental study of a copolymerization reactor. **Chemical Engineering Science**, v.50, p. 715-736, 1995.

QUENTAL, Antonio Carlos; CARVALHO, Fabiana Pires de; TADA, Eduardo Dos Santos; FELISBERTI, Maria Isabel. Blendas de PHB e seus copolímeros: miscibilidade e compatibilidade. **Química Nova**, v. 33, p.438-446, Jan. 2010.

QUINTANAR-GUERRERO, David; TAMAYO-ESQUIVE, David; GANEM-QUINTANA, Adriana; ALLÉMANN, Eric; DOELKER, Eric. Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 211-218. Oct. 2005.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; FESSI, H.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D-L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. **International Journal Of Pharmaceutics**, V. 143, p. 133-141. 8 Nov. 1996.

RATHBONE, Michael J.; HADGRAFT, Jonathan; ROBERTS, Michael S. (Ed.). **Modified-Release Drug Delivery Technology**. New York: Marcel Dekker, 2002.

RAO, J. Prasad; GECKELER, Kurt E.. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress In Polymer Science**, v. 36, p. 887-913. July 2011.

REIS, Catarina P.; NEUFELD, Ronald J.; RIBEIRO, António J; VEIGA, Francisco. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology And Medicine*, v. 2, p. 8-21. Mar. 2006.

ROMIO, Ana. P; SAYER, Claudia; ARAÚJO, Pedro. H. H; AL-HAYDARI, Mariam; WU, Libo; da ROCHA, Sandro. P. Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization with Biodegradable Surfactant and Hydrophobe. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 210, p. 747-751. May 2009.

SANTANDER-ORTEGA, Manuel J.; CSABA, Noemi; GONZÁLEZ, Lisette; BASTOS-GONZÁLEZ, Delfina; ORTEGA-VINUESA, Juan L.; ALONSO, Maria J.. Protein-loaded PLGA-PEO blend nanoparticles: encapsulation, release and degradation characteristics. **Colloid Polymer Science**, v. 288, p. 141-150, 2010.

SAYER, Claudia; ARAUJO, Pedro H. H.. Synthesis of Polymer Particles with Core-Shell Morphologies. In: MITTAL, Vital. (Org.), **Advanced Polymer Nanoparticles: Synthesis and Surface Modifications**. Londres: CRC Press, 2010. p. 31-64.



SCHAFFAZICK, Scheila Rezende; GUTERRES, Sílvia Stanisçuaski; FREITAS, Liane de Lucca; POHLMANN, Adriana Raffin. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p.726-737, Sept./Oct. 2003.

SCHORK, F. Joseph; LUO, Yingwu; SMULDERS, Wilfred; RUSSUM, James P.; BUTTÉ, Alessandro; FONTENOT, Kevin. Miniemulsion Polymerization. **Advances In Polymer Science**, v. 175, p.129-255, 2005.

SIMÕES, Marcelo S.. **Desenvolvimento e estudo in vitro de implante biorreabsorvível em Poli (L-lactídeo) (PLLA) para artrodese de coluna lombar**. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2007.

SOARES, Mariana da Volta. **Desenvolvimento e Avaliação de Nanopartículas de Poli-ε-caprolactona contendo Zinco(II)ftalocianina para Uso na Terapia Fotodinâmica do Câncer**. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

SONG, Ki Chang; LEE, Ho Seok; CHOUNG, Il Yeop; CHO, Kyung In; AHN, Yangkyu; CHOI, Eun Jung. The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects**, v. 276, p. 162-167. Mar. 2006.

SOPPIMATH, Kumares S.; AMINABHAVI, Tejraj M.; KULKARNI, Anandrao R.; RUDZINSKI, Walter E.. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal Of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20. Jan. 2001.

STEINMACHER, Fernanda R.. **Síntese de nanopartículas de Poli(Acetato de Vinila) via polimerização em miniemulsão**. 167 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

SUNDBERG, Donald C.; DURANT, Yvon G.. Latex Particles Morphology, Fundamental Aspects: A Review. **Polymer Reaction Engineering**, v. 11, p. 379-432. 2003.

TICE, Thomas R.; GILLEY, Richard M.. Preparation of injectable controlled-release microcapsules by a solvent-evaporation process. **Jornal of Controlled Release**, v. 2, p. 343-352. 1985.

TRIERWEILER, Luciane F.. **Nanopartículas: como Produzi-las em Escala Industrial**. 214 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

TSUJI, Hideto. In vitro hydrolysis of blends from enantiomeric poly(lactide)s. Part 4: well-homo-crystallized blend and nonblended films. **Biomaterials**, v.24, p. 537-547. Feb. 2003.

UCHEGBU, Ijeoma F.; SCHATZLEIN, Andreas G. (Ed.). **Polymers in Drug Delivery**. United States: CRC Press, 2006.

UEDA, M.; IWARA, A.; KREUTER, J.. Influence of the preparation methods on the drug release behaviour of loperamide-loaded nanoparticles. **Journal Of Microencapsulation**, v. 15, p. 361-372. 1998.

URBAN, Markus; MUSYANOVYCH, Anna; LANDFESTER, Katharina. Fluorescent Superparamagnetic Polylactide Nanoparticles by Combination of Miniemulsion and Emulsion/Solvent Evaporation Techniques. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 210, p. 961-970. May 2009.

VERGER, Martine Leroueil-le; FLUCKIGER, Laurence; KIM, Young-il; HOFFMAN, Maurice; MAINCENT, Philippe. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, v. 46, p. 137-143. Set. 1998.

WHO – World Health Organization. **Global tuberculosis control: WHO report 2010**. 2010(a).

WHO – World Health Organization. **The Global Plan to Stop TB 2011-2015: Transforming the Fight Towards elimination of Tuberculosis**. 2010(b).

ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. L.; MERCADO-SILVA, E.; GUTIÉRREZ-CORTEZ, E. CASTAÑO-TOSTADO, E.; QUINTANAR-GUERRERO, D.. Optimization of nanocapsules preparation by the emulsion–diffusion method for food applications. **LWT - Food Science And Technology**, p. 1-7. 2010.

ZAMPIERI, Ana Lúcia Teixeira de Carvalho. **Desenvolvimento, Caracterização e Avaliação da Permeação Cutânea da Isoflavona Genisteína em Nanocápsulas Poliméricas**. 220 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2009.

ZHANG, Guobao; ZHANG, Jianming; WANG, Shenguo; SHEN, Deyan. Miscibility and Phase Structure of Binary Blends of Polylactide and Poly(methyl methacrylate). **Journal Of Polymer Science: Part B: Polymer Physics**, v. 41, p. 23-30. Jan. 2003.

ZHOU, Changchun; MA, Liang; LI, Wei; YAO, Donggang. Fabrication of tissue engineering scaffolds through solid-state foaming of immiscible polymer blends. **Biofabrication**, v. 3, 045003 (8pp). 10 Dec. 2011.